

Aus dem Institut für Zytobiologie  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Roland Lill  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



**ROLLE DES MITOCHONDRIALEN CARRIERS RIM2  
UND DES TRANSKRIPTIONSFAKTORS YAP5  
IM EISENMETABOLISMUS VON  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Nicole Rietzschel**

aus Suhl

Marburg, 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg am: 18. März 2014

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Roland Lill

Korreferent: Prof. Dr. Michael Bölker

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>Summary .....</b>	<b>3</b>
<b>1     Einleitung .....</b>	<b>5</b>
1.1 Eisen und seine physiologische Relevanz .....	5
1.2 Der Eisenmetabolismus in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	7
1.3 Die Rolle der Mitochondrien im Eisenmetabolismus .....	10
1.3.1 Die Rolle der mitochondrialen Carrier im Eisenmetabolismus .....	13
1.4 Regulation der Eisenhomöostase in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	16
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit .....	19
<b>2     Ergebnisse .....</b>	<b>21</b>
2.1 Die Rolle des mitochondrialen Carriers Rim2 im Eisenmetabolismus .....	21
2.1.1 Die Überexpression von <i>RIM2</i> komplementiert die Häm- und Fe/S-Cluster Synthesedefekte in <i>mrs3/4Δ</i> Zellen .....	22
2.1.2 <i>rim2Δ</i> Zellen haben keinen Fe/S-Cluster Synthesedefekt, aber verstärken den Defekt in <i>mrs3/4Δ</i> Zellen .....	25
2.1.3 Die <i>RIM2</i> Deletion hat keinen Einfluss auf die Häm-Synthese.....	29
2.1.4 Die <i>RIM2</i> Deletion verursachte keine Defekte im Eisenmetabolismus von <i>mrs4Δ</i> Zellen .....	31
2.2 Charakterisierung des Eisen-Sensors Yap5 .....	35
2.2.1 Der Transkriptionsfaktor Yap5 bindet einen Fe/S-Cluster zur Aktivierung der Expression von <i>CCC1</i> bei Eisenüberschuss .....	36
2.2.2 <i>In vitro</i> Charakterisierung des Fe/S-Clusters von Yap5 .....	41
2.2.3 tYap5 bindet einen Fe/S-Cluster Sensor an der N-terminalen CRD .....	46
2.2.4 Gereinigtes tYap5 bindet einen Fe/S-Cluster am n- und c-CRD .....	50
2.2.5 Die Fe/S-Cluster Bindung induziert Konformationsveränderungen in gereinigtem tYap5.....	53
2.2.6 Der Fe/S-Cluster an tYap5 ist empfindlich gegenüber Metallchelatoren.....	57
2.3 Der Transkriptionsfaktor HapX ist ein Fe/S-Protein .....	60

2.3.1	tHapX assembliert einen ISC- und CIA-abhängigen Fe/S-Cluster .....	60
2.3.2	Die c-CRD des HapX ist an der Koordination eines Fe/S-Cofaktors beteiligt .....	63
<b>3</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>66</b>
3.1	Die Rolle des Pyrimidin-Transporters Rim2 in der mitochondrialen Eisenversorgung .....	66
3.2	Die Rolle des Transkriptionsfaktors Yap5 in der Eisenhomöostase .....	72
3.3	Der bZIP-Transkriptionsfaktors HapX zeigt strukturelle Ähnlichkeiten zu der Fe/S-Cluster-bindenden Domäne von Yap5.....	79
<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>82</b>
4.1	Geräte.....	82
4.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterial .....	83
4.2.1	Größenstandards .....	85
4.2.2	Enzyme .....	85
4.2.3	Oligonukleotide .....	86
4.2.4	Plasmide .....	87
4.2.5	Hefestämme.....	89
4.2.6	Bakterienstämme .....	90
4.3	Molekularbiologische Methoden .....	91
4.3.1	Polymerase Kettenreaktion.....	91
4.3.2	<i>In vitro</i> Mutagenese durch PCR-Reaktion .....	91
4.3.3	Reinigung von DNA .....	91
4.3.4	Agarosegelelektrophorese .....	92
4.3.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> .....	92
4.3.6	Analytischer Restriktionsverdau .....	92
4.3.7	Ligation von DNA-Fragmenten .....	92
4.4	Zellbiologische Methoden.....	93
4.4.1	Kultivierung von Hefestämme.....	93
4.4.2	Herstellung von <i>rho</i> <sup>0</sup> Zellen.....	93
4.4.3	Transformation von Hefezellen.....	93
4.4.4	Dauerkulturen von <i>S. cerevisiae</i> .....	94
4.4.5	Hefezelllysate mittels alkalischer Lyse .....	94
4.4.6	Präparation von Hefegesamtzellextrakt mittels Glasperlen.....	94
4.4.7	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	95
4.4.8	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	95
4.4.9	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	95
4.5	Biochemische Methoden .....	96
4.5.1	Kopplung von Antikörpern an Protein A Sepharose .....	96

4.5.2	(Co-)Immunpräzipitation (CoIP) .....	96
4.5.3	Bestimmung der <i>de novo</i> Fe/S-Cluster Synthese in <i>S. cerevisiae</i> .....	96
4.5.4	Bestimmung der <i>de novo</i> Häm-Synthese in <i>S. cerevisiae</i> .....	97
4.5.5	Messung der Aconitase-Enzymaktivität .....	97
4.5.6	Messung der Catalase-Enzymaktivität .....	98
4.5.7	Messung der Malat-Dehydrogenase-Aktivität .....	98
4.5.8	Bestimmung der Luciferase-Aktivität .....	99
4.6	Proteinbiochemische Methoden .....	99
4.6.1	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	99
4.6.2	Trichloressigsäure-Fällung (TCA-Fällung) .....	99
4.6.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	100
4.6.4	Färben von Proteinen mit <i>Coomassie</i> Brilliant-Blue .....	100
4.6.5	Western Blot .....	100
4.6.6	Immundetektion von Proteinen .....	101
4.6.7	Heterologe Genexpression von rekombinantem Yap5 .....	101
4.6.8	Präparativer Zellaufschluss von <i>E. coli</i> .....	102
4.6.9	Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA .....	102
4.6.10	Gelfiltrationschromatographie .....	102
4.6.11	Umpuffern von Proteinen .....	103
4.6.12	Konzentrierung von Proteinen .....	103
4.6.13	Chemische Rekonstitution von Fe/S-Proteinen .....	103
4.6.14	Bestimmung des Sulfidionengehalts .....	104
4.6.15	Bestimmung des Eisenionengehalts .....	104
4.6.16	UV/VIS-Spektroskopie .....	105
4.6.17	Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) .....	105
4.6.18	Probenvorbereitung für Elektronenspinresonanz-Spektroskopie .....	105
4.6.19	Probenvorbereitung für Mößbauer-Spektroskopie .....	106
5	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>107</b>
6	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>115</b>
7	<b>Verzeichnis der akademischen Lehrer .....</b>	<b>116</b>
8	<b>Publikationen und Tagungsbeiträge .....</b>	<b>117</b>
9	<b>Danksagung .....</b>	<b>119</b>

## Zusammenfassung

Eisen ist ein essentielles Spurenelement mit entscheidenden Funktionen in einer Vielzahl an metabolischen Prozessen wie der mitochondrialen Atmung, Aminosäure- und Nukleotid-Synthese, Ribosomen-Assemblierung, DNA-Replikation und DNA-Reparatur. Jedoch sind erhöhte zelluläre Eisenkonzentrationen toxisch für die Zelle. Daher ist eine exakte Regulation des intrazellulären Transports und der Erfassung des Eisenstatus erforderlich, um sowohl Eisenmangel als auch Eisenüberschuss zu vermeiden. Die vorliegende Arbeit widmet sich deshalb dem Mechanismus der mitochondrialen Eisenaufnahme und der Adaption an erhöhte Eisenmengen.

Mitochondrien sind essentielle Organellen, die unter anderem eine entscheidende Rolle in der Eisen-Schwefel-(Fe/S)-Cluster- und in der Häm-Biogenese spielen. Aufgrund dieser Stoffwechselleistungen konsumieren Mitochondrien den größten Anteil des in die Zelle aufgenommenen Eisens. Frühere Studien konnten die mitochondrialen Carrier-Proteine Mrs3 und Mrs4 als mitochondriale Eisentransporter charakterisieren. Allerdings ist die simultane Deletion beider Gene für die Hefezellen nicht letal. Da die Fe/S-Cluster Biogenese essentiell ist, lässt dies auf einen weiteren Carrier schließen, der ebenfalls in der Lage ist, Eisenionen zu transportieren. Ein vielversprechender Kandidat ist der mitochondriale Carrier Rim2. Auch wenn dieser ursprünglich als Pyrimidintransporter charakterisiert wurde, häufen sich die Hinweise auf eine zusätzliche Funktion in der Eisenaufnahme. Dabei stellt sich die Frage, inwiefern sich die gut dokumentierte Transportfunktion für Pyrimidine mit einer möglichen Rolle im Eisentransport vereinen ließe. Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche Deletion von *RIM2* die in *mrs3/4Δ* Zellen vorhandene Defekte im Wachstum und in der Biosynthese von Eisen-abhängigen Proteinen verstärkt. Dagegen rettet die Überexpression von *RIM2* in *mrs3/4Δ* Zellen die Maturierung der Fe/S-Proteine und der Häm-Synthese auf Wildtypniveau. Demzufolge sind hohe Konzentrationen von Rim2 ausreichend, um die mitochondriale Eisenversorgung in *mrs3/4Δ* Zellen wiederherzustellen. Der direkte biochemische Nachweis für eine Transportfunktion von Rim2 wurde durch *in vitro*-Transportexperimente mit sog. submitochondrialen Partikeln in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Dr. Wiesenberg (Wien) geliefert. Zusammengenommen zeigen die *in vivo*, *in organello* und *in vitro* Experimente, dass Rim2 als mitochondrialer Carrier den obligatorischen Co-Transport von Pyrimidinen und divalenten Metallionen einschließlich  $\text{Fe}^{2+}$  vermittelt. Diese Modelvorstellung erklärt, wie die mitochondriale Eisenaufnahme in *mrs3/4Δ* Zellen gesichert werden

kann und wie Rim2 als „*high copy suppressor*“ von *mrs3/4Δ* Zellen fungiert. Eine Funktion des Rim2 in der mitochondrialen Eisenhomöostase unter normalen physiologischen Bedingungen, d.h. in Anwesenheit von Mrs3 und Mrs4, ist jedoch vernachlässigbar.

Der zweite Teil dieser Arbeit konzentrierte sich auf die Charakterisierung des Sensors für hohe Eisenkonzentrationen, Yap5, der eine zentrale Rolle bei der Anpassung an toxische Eisenmengen in *S. cerevisiae* spielt. Bei Eisenüberschuss aktiviert der Transkriptionsfaktor Yap5 die Expression von *CCC1*, dem einzigen bekannten vakuolären Eisenimporter, was zur Speicherung von Eisen in der Vakuole und damit zur Vermeidung einer toxischen Eisenakkumulation im Cytosol führt. Wie Yap5 biochemisch den Eisenstatus der Zelle erfasst, ist allerdings unklar. Zunächst konnte die direkte Bindung von radioaktivem Eisen ( $^{55}\text{Fe}$ ) an die Aktivator-Domäne von Yap5 (tYap5) *in vivo* nachgewiesen werden. Zirkulardichroismus-, Elektronenspinresonanz- und Mößbauer-Spektroskopie des rekombinanten tYap5 belegten die Bindung eines [2Fe-2S]-Clusters an tYap5 nach chemischer Rekonstitution. Dieser [2Fe-2S]-Cluster wird durch die N-terminale Cystein-reiche Domäne (n-CRD) in der Aktivator-Domäne koordiniert und ist entscheidend für die transkriptionelle Aktivität. Des Weiteren induziert die Fe/S-Cluster-Bindung an tYap5 eine Konformationsänderung, die möglicherweise geeignet ist, die Transkriptionsaktivität von Yap5 zu modulieren. Zusätzlich bindet Yap5 *in vitro* einen zweiten Fe/S-Cofaktor an der C-terminalen CRD, der nicht an der Regulation der transkriptionellen Aktivität von Yap5 *in vivo* beteiligt ist. Dagegen ist das Fe/S-Cluster-Bindungsmotiv innerhalb der regulatorischen n-CRD von Yap5 in mehreren Pilzarten konserviert, u.a. auch im *Aspergillus* Transkriptionsfaktor HapX. Daher könnte dieses Motiv als konservierte Bindungsstelle für einen sensorischen Fe/S-Cluster in der eukaryotischen Stressantwort fungieren. Zusammengefasst hat diese Arbeit an Yap5 grundlegende neue Einblicke in den transkriptionellen Mechanismus der Erfassung und Regulation des Eisenstatus in Pilzen geliefert. Yap5 konnte somit als erster eukaryotischer Transkriptionsfaktor, der einen Fe/S-Cluster als Sensor für intrazelluläre Eisenkonzentrationen nutzt, charakterisiert werden.

## Summary

Iron is an essential trace element for life and has a fundamental role in many metabolic processes including mitochondrial respiration, amino acid and nucleotide synthesis, ribosome assembly, DNA replication and DNA repair. However, elevated levels of cellular iron are highly toxic, necessitating sophisticated strategies for intracellular transport and sensing of iron to avoid both iron deprivation and iron overload. The current work was concentrated on the mechanism of mitochondrial iron supply and the mode of sensing high iron concentrations within the cytoplasm.

Mitochondria utilize the majority of the cellular iron for the biogenesis of iron-sulfur (Fe/S) proteins and heme. Previous studies have identified a critical role of the mitochondrial carrier proteins Mrs3 and Mrs4 in iron uptake, yet deletion of their genes in yeast is not lethal. Since the process of Fe/S protein biogenesis is essential for cell viability, alternative pathways for iron uptake into mitochondria must exist. Recently, overproduction of the mitochondrial carrier Rim2 was shown to suppress the phenotype of *mrs3/4Δ* cells in iron transport suggesting that this carrier protein may serve as another iron transporter in *S. cerevisiae*. Surprisingly, Rim2 was also shown to function as a pyrimidine nucleotide transporter raising the question of how the latter well-defined role may be compatible with an iron transport function. The first part of this work provides evidence that the deletion of *RIM2* in *mrs3/4Δ* cells exacerbated their poor growth, and had a further negative impact on the biogenesis of mitochondrial Fe/S proteins. Conversely, overexpression of *RIM2* was able to restore Fe/S protein maturation and heme synthesis of *mrs3/4Δ* cells to wild-type levels suggesting that high concentrations of Rim2 facilitate mitochondrial uptake of reasonable amounts of iron. Direct biochemical evidence for this idea was derived from *in vitro* transport experiments in collaboration with Dr. Wiesenberger and colleagues using sub-mitochondrial particles and a trapped fluorescent dye which is quenched by iron. Collectively, the combination of *in vivo*, *in organello*, and *in vitro* studies suggest that the mitochondrial carrier Rim2 obligatorily co-translocates pyrimidine nucleotides and divalent metals including iron. Under physiological conditions, however, the majority of iron is transported via Mrs3 and Mrs4.

The second part of this work was focused on the iron-sensing transcription factor Yap5 from *S. cerevisiae* that plays a central role in the adaptation of budding yeast to toxic iron levels. The divalent metal transporter Ccc1, the only known vacuolar iron importer in fungi and plants is crucial for this detoxification. Recently, the transcription factor Yap5 was

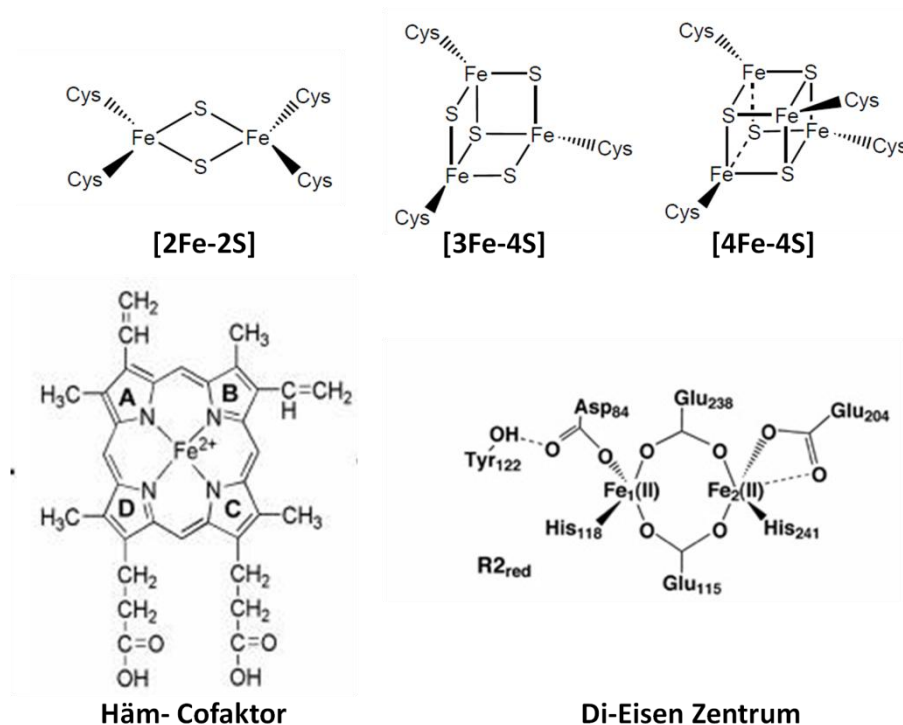


shown to activate the expression of *CCC1*. The biochemical mechanism underlying iron sensing by Yap5 is so far unknown. Here, I show that the activator domain of Yap5 (tYap5) binds radioactive iron ( $^{55}\text{Fe}$ ) when tYap5 is overproduced in yeast. Circular dichroism, electron paramagnetic resonance, and Mössbauer spectroscopy of recombinant tYap5 showed that the protein binds a [2Fe-2S] cluster after chemical reconstitution. This [2Fe-2S] cluster is coordinated by the N-terminal cysteine-rich domain (n-CRD) of the activator domain and is essential for transcriptional activity. Fe/S cluster binding to tYap5 induces a conformational change that likely modulates the transcriptional activity of Yap5. Surprisingly, *in vitro* Yap5 binds a second Fe/S cofactor at the C-terminal CRD, yet this metal binding motif is not involved in iron sensing *in vivo*. The Fe/S cluster binding motif within the n-CRD regulatory domain of Yap5 is conserved in the basic leucine zipper transcription factor HapX that is wide-spread in fungi and that is crucial for virulence of fungal pathogens. Hence, the Fe/S cluster of Yap5 represents a novel sensor module that is frequently utilized by eukaryotic stress response regulators. Taken together, the work on Yap5 has provided fundamental new insights into the mechanism of high iron sensing and regulation by iron-responsive transcription factors in fungi.

# 1 Einleitung

## 1.1 Eisen und seine physiologische Relevanz

Eisen (Fe) ist ein essentielles Spurenelement in allen Eukaryoten und nahezu allen Bakterien. Es ist aber auch ein zweischneidiges Schwert, da es einerseits als Cofaktor zahlreicher zellulärer Prozesse notwendig ist, aber andererseits im Überschuss toxisch wirkt. In Form von Mono- oder Di-Eisenzentren oder als Teil von Häm oder Eisen-Schwefel (Fe/S)-Clustern spielt es eine entscheidende Rolle in einer Vielzahl von zellulären Prozessen (Lill *et al.* 2012). Fe/S-Cluster bestehen aus Eisen- ( $\text{Fe}^{2+/3+}$ ) und Sulfid ( $\text{S}^{2-}$ )-Ionen, wobei die Eisenionen in der Regel von Cystein- oder Histidinresten koordiniert werden (Beinert *et al.* 1997). Die meisten Fe/S-Proteine binden rhombische [2Fe-2S]-, kubane [4Fe-4S]- oder [3Fe-4S]-Cluster (Abb. 1-1).



**Abb. 1-1 Schematischer Aufbau Eisen-haltiger Cofaktoren.** Gezeigt sind die Strukturen des rhombischen [2Fe-2S]- und des kubanen [3Fe-4S]- bzw. [4Fe-4S]-Clusters sowie die Struktur von Häm *b*- und eines Di-Eisenzentrums (von Rnr2). (Modifiziert nach Han *et al.* 2005, Kiley & Beinert 2003, Kim *et al.* 2012)

Die strukturelle Vielfalt von Fe/S-Clustern in Kombination mit verschiedenen Proteinumgebungen erklärt die große Anzahl an unterschiedlichen biologischen Funktionen von Fe/S-Proteinen. Eine große Mehrheit der Fe/S-Proteine dient der Elektronenübertragung, wie z.B. der mitochondrialen oder bakteriellen Atmungskette (Ayala-Castro *et al.* 2008). Ein Elektronentransfer durch Fe/S-Cluster wird dadurch ermöglicht, dass Eisenionen zwischen den beiden Redoxzuständen +2 und +3 wechseln können. Fe/S-Cofaktoren sind darüber hinaus auch Teil anabolischer und katabolischer Enzyme. Beispiele hierfür sind die mitochondriale Aconitase, ein Enzym des Citratzyklus, und die Radikal-S-Adenosylmethionin (SAM) Enzyme. Diese Proteinfamilie katalysiert eine Vielzahl von Reaktionen in der Biosynthese und dem Abbau von Vitaminen, Cofaktoren, Antibiotika und Herbiziden. Beispiele von Radikal-SAM Enzymen sind die Biotinsynthase Bio2 und die Liponsäuresynthase Lip5 (Booker *et al.* 2007). Als weiterer Vertreter enzymatisch aktiver Fe/S-Proteine ist im Cytosol die [4Fe-4S]-Cluster tragende Isopropylmalat-Isomerase (Leu1) für die Biosynthese des Leucins verantwortlich (Kohlhaw 2003). In letzter Zeit sind weitere, essentielle Fe/S-Proteine mit einer Funktion im DNA-Metabolismus und in der Erhaltung der genomischen Stabilität identifiziert worden (Stehling *et al.* 2012, White & Dillingham 2012). Als klassisches Beispiel von Häm-bindenden Proteinen gilt die cytosolische sowie peroxisomale Catalase, die die Umwandlung von Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser katalysiert. Des Weiteren gibt es Eisen-abhängige Proteine wie z.B. die Ribonukleotidreduktase Untereinheit Rnr2, mit einem Di-Eisen Tyrosyl-Radikal Cofaktor (Abb. 1-1) (Perlstein *et al.* 2005). Im RNR-Komplex ist die Untereinheit Rnr2 an der Nukleotid-Konvertierung zu einem Deoxynukleotid beteiligt (Cotruvo & Stubbe 2011).

Ein Überangebot an freiem Eisen kann toxische Auswirkungen in der Zelle hervorrufen, da reduziertes Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) über die Fenton-Reaktion zur Bildung von zellschädigenden Hydroxylradikalen führt, und somit oxidativen Stress generieren kann (Halliwell & Gutteridge 1984). Daher ist eine exakte Regulation der Eisenaufnahme, der intrazellulären Verteilung, sowie der Wiederverwertung von Eisen zur Vermeidung freier Ionen im Cytosol von essentieller Bedeutung (Kaplan & Kaplan 2009, Lill *et al.* 2012).

In nicht-erythropoetischen Zellen wird der Großteil des zellulären Eisens in den Mitochondrien umgesetzt. Dieses Organell ist für den Eisenmetabolismus der gesamten eukaryotischen Zelle von der Hefe bis zum Menschen essentiell. Jedoch sind die Mechanismen der mitochondrialen Eisenaufnahme noch nicht vollständig geklärt. Die Identifizierung weiterer möglicher mitochondrialer Eisentransporter bildet daher den ersten Schwerpunkt dieser Arbeit.

Beim Spurenelement Eisen ist nicht nur die exakte Regulation der intrazellulären Verteilung entscheidend. Zellen müssen auch in der Lage sein, auf hohe Fluktuationen in der extrazellulären Eisenverfügbarkeit zu reagieren. Dies gilt besonders für Einzeller, wie z.B. Hefen. In Hefen und anderen Pilzen spielt die Speicherung überschüssigen Eisens in der Vakuole eine zentrale Rolle bei der Anpassung an hohe Eisenkonzentrationen. Allerdings ist bisher wenig über die Regulation der Adaption an toxische Eisenmengen bekannt. Dieses Thema bildet den zweiten Schwerpunkt dieser Arbeit.

## 1.2 Der Eisenmetabolismus in *Saccharomyces cerevisiae*

Als genetisch einfach manipulierbarer, einzelliger Eukaryot ist die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) als Modelorganismus zur Untersuchung der zellulären und molekularen Mechanismen des Eisentransports und der Regulation der zellulären Eisenhomöostase gut geeignet. Die Bioverfügbarkeit von Eisen ist gering, da Eisen unter aeroben Bedingungen zum unlöslichen Eisen(III)-Hydroxid-Komplex reagiert und die Konzentration der Eisenionen für Organismen zum Wachstums-limitierenden Faktor wird (Lyons & Eide 2007, Gitlin & Lill 2012). Daher besitzen die Organismen verschiedene Systeme zur effizienten Aufnahme von Eisen (Abb. 1-2). *S. cerevisiae* verfügt über ein hochaffines und ein niederaffines System zur Aufnahme von ionischem Eisen, aber auch Siderophor-gebundenes Eisen kann aufgenommen und verwertet werden (Abb. 1-2) (Sutak *et al.* 2008, Kosman 2010). Da *S. cerevisiae* keine eigene Synthesemaschinerie für Siderophore besitzt, können nur Xenosiderophore, die von anderen Mikroorganismen produziert wurden, aufgenommen werden. Hierfür exprimiert die Hefezelle verschiedene Transporter (Arn1-4) und Zellwandproteine (Fit1-3). Das hochaffine System zur Aufnahme von freien Eisenionen besteht aus einem in der Plasmamembran lokalisierten Proteinkomplex, der Ferroxidase Fet3, der Permease Ftr1 sowie der Metalloreduktasen Fre1 und Fre2 (Abb. 1-2). Die Metalloreduktasen Fre1/Fre2 reduzieren das in der Natur abundante  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$ , welches dann als Substrat für Fet3/Ftr1 dient. Die  $\text{Cu}^{2+}$ -abhängige Ferroxidase Fet3 oxidiert  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$  um dieses anschließend über die Permease Ftr1 ins Zellinnere zu transportieren. Die Kupferabhängigkeit von Ferroxidasen ist die molekulare Ursache der Vernetzung des Kupfer- und Eisenstoffwechsels in Eukaryoten (Dancis *et al.* 1994). Die Permease Ftr1 gehört zusammen mit Fth1, einem vakuolären Eisentransporter, zu einer Familie von Oxidase-abhängigen Transportern, deren Mechanismus

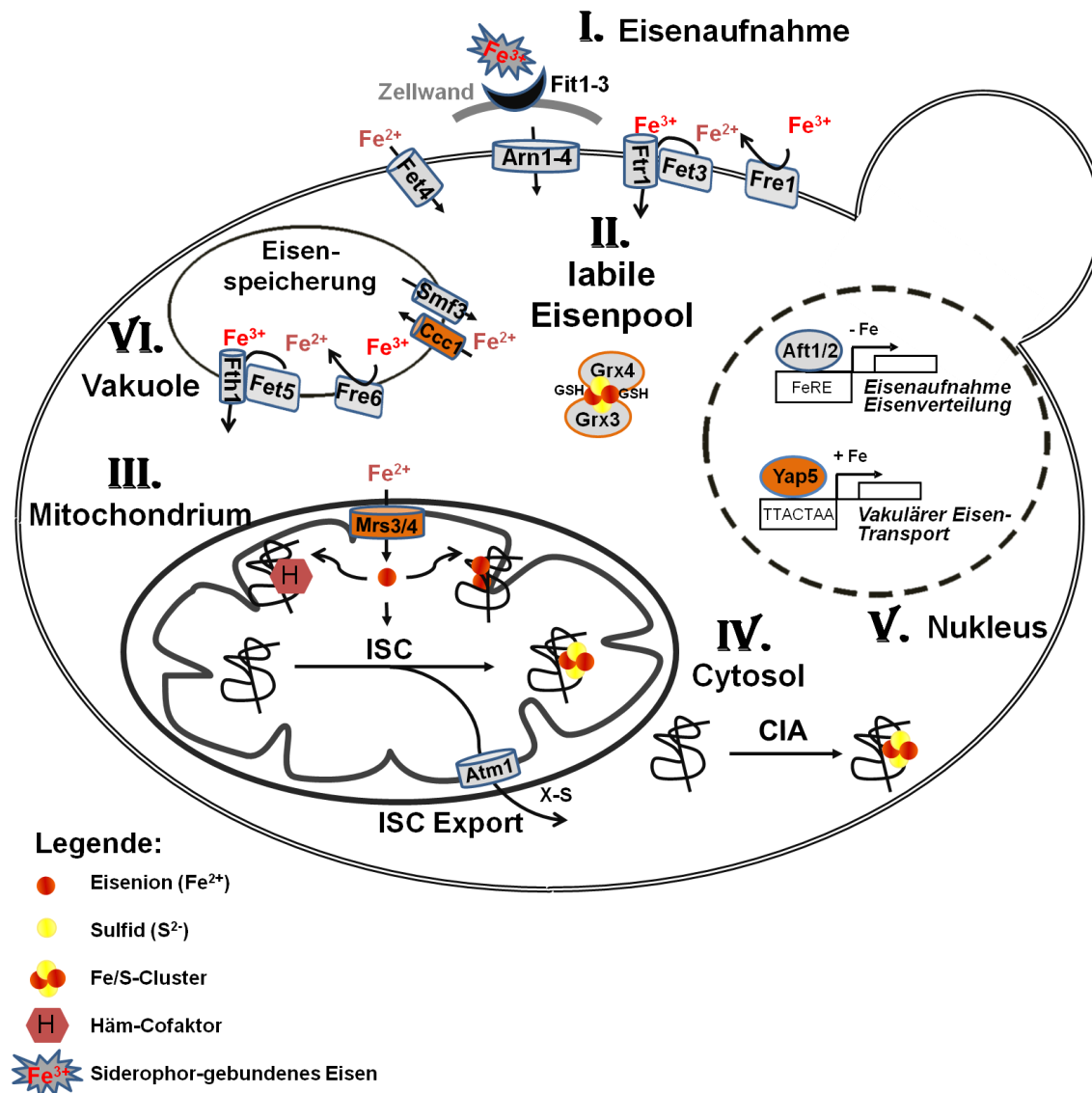
und Energieabhängigkeit noch völlig unklar ist. Das niedrigaffine Eisenaufnahmesystem besteht aus Fet4, das direkt  $\text{Fe}^{2+}$  in die Zelle transloziert. Unter anaeroben Bedingungen ist Fet4 der Haupteisentransporter in *S. cerevisiae* (Jensen & Culotta 2002).

Das aufgenommene Eisen bindet im Cytosol der Zelle an niedermolekularen Substanzen und stellt so den hypothetischen, labilen Eisenpool der Zelle dar. Durch die cytosolisch-nukleären Glutaredoxine Grx3 und Grx4 wird das Eisen auf mechanistisch, unklarem Weg in eine bioverfügbare Form umgewandelt und zum intrazellulären Transport und Einbau in Proteinen bereitgestellt (Abb. 1-2) (Muhlenhoff *et al.* 2010). Grx3/4 koordinieren selbst einen gebrückten  $[2\text{Fe-2S}]$ -Cluster, der entscheidend für deren Funktion ist. Dabei fungieren je ein Cysteinrest im aktiven Zentrum der Glutaredoxine sowie zwei nicht-kovalent gebundene Glutathione (GSH) als Liganden des Fe/S-Clusters (Li *et al.* 2009, Picciocchi *et al.* 2007). Das intrazelluläre Eisen wird u.a. den Mitochondrien, dem entscheidenden Eisen-verwertenden Organell, zur Verfügung gestellt (Muhlenhoff *et al.* 2010).

Zum einen wird das Eisen in den Mitochondrien für die Synthese des Häm-Cofaktors, dessen erste und letzte Schritte ebenfalls in den Mitochondrien katalysiert werden, verwendet (Hamza & Dailey 2012). Zum anderen wird Eisen in Eisen-bindenden Proteine und über die Fe/S-Cluster (ISC)-Assemblierungs-Maschinerien in Fe/S-Proteine inseriert (Abb. 1-2) (Lill *et al.* 2012). In mehreren Studien wurden die mitochondrialen Carrier Mrs3 und Mrs4 als Eisentransporter charakterisiert (Foury & Roganti 2002, Muhlenhoff *et al.* 2003b, Shaw *et al.* 2006, Paradkar *et al.* 2009). Die Deletion beider Carrier verursacht allerdings keinen letalen Phänotyp in *S. cerevisiae*. Folglich müssen weitere mitochondriale Eisenaufnahmesysteme existieren.

In den Mitochondrien kommt neben der ISC-Assemblierungs- noch eine ISC-Export-Maschinerie vor. Letzteres exportiert eine unbekannte Schwefel-haltige Komponente (X-S) ins Cytosol. Diese Komponente und somit die Funktionalität beider Maschinerien ist entscheidend für die Maturierung jeglicher extra-mitochondrialer Fe/S-Proteine (Kispal *et al.* 1999).

Für die Biogenese der cytosolischen und nukleären Fe/S-Cluster wird zusätzlich die *cytosolic iron-sulfur protein assembly* (CIA)-Maschinerie benötigt. Das Eisen für die Maturierung der Fe/S-Cluster- aber auch Eisen-bindender Proteine wird mit Hilfe von Grx3/4 bereitgestellt (Netz *et al.* 2013).



**Abb. 1-2 Schematischer Überblick des Eisenmetabolismus in *S. cerevisiae*.** **I.** Die Aufnahme von ionischem Eisen erfolgt über ein hochaffines und ein niederaffines System, aber auch Siderophor-gebundenes Eisen kann aufgenommen werden. **II.** Im Cytosol binden die Eisenionen an niedermolekulare Komponenten und bilden über einen mechanistisch unbekannten Weg einen hypothetischen ‚labilen Eisenpool‘. Mit Hilfe von Grx3/4 (humanes Picot) wird dieses bioverfügbare Eisen in der Zelle zu den Eisen-verbrauchenden Zellkompartimenten, wie z.B. den Mitochondrien transportiert. **III.** Die mitochondriale Eisenaufnahme erfolgt über die Carrier Mrs3 und Mrs4 (humanes Mitoferrin). In den Mitochondrien wird Eisen zur Synthese von Eisen-abhängigen Proteinen, zur Synthese von Häm, sowie zur Fe/S-Cluster Biogenese (ISC) bereitgestellt. Zusätzlich wird über den Transporter Atm1 (humanes ABCB7) (ISC Export Maschinerie) eine Schwefel-haltige Komponente (X-S) ins Cytosol transloziert, die für die Maturierung cytosolischer und nukleärer Proteine essentiell ist. **IV.** Im Cytosol wird Eisen mit Hilfe von Grx3/4 für die Reifung von Eisen-abhängigen Enzymen und zur Fe/S-Cluster Assemblierung (CIA-Maschinerie) verwertet. **V.** Die transkriptionelle Regulation bei Eisenmangel erfolgt über Aft1/2. Diese Transkriptionsfaktoren aktivieren das sog. Eisenregulon (FeRE), welches u.a. die zelluläre Eisenaufnahme erhöht. Bei ausreichender Eisenversorgung wird Aft1/2 über Grx3/4 inaktiviert. **VI.** Überschüssiges Eisen wird zur Speicherung über den divalenten Metallionen Transporter Ccc1 in die Vakuole exportiert. Die Expression des *CCC1* Gens wird durch den Hocheisen-Sensor Yap5 reguliert. Nähere Details zum Eisenmetabolismus sind im Text enthalten.

Die Kontrollmechanismen zur Aufrechterhaltung eines physiologisch adäquaten Eisenniveaus trotz veränderter Umweltbedingungen finden sowohl auf der transkriptionellen als auch auf der posttranskriptionellen Ebene statt. In *S. cerevisiae* wird bei Eisenmangel über die Transkriptionsfaktoren Aft1 und Aft2 die Eisenaufnahme erhöht (Abb. 1-2). Über ihre Funktionsweise wurde intensiv geforscht, dagegen ist über die Regulation bei zellulärem Eisenüberschuss noch wenig bekannt. Überschüssiges cytosolisches Eisen wird zur Detoxifizierung in die Vakuole exportiert. Dies erfolgt über den einzigen bekannten vakuolären divalenten Metall-Importer Ccc1. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Expression von *CCC1* über den bZIP-Transkriptionsfaktor Yap5 reguliert wird (Li *et al.* 2008). Wie Yap5 den Eisenstatus der Zelle erfasst, ist allerdings unklar. Genetische Studien konnten lediglich einen Einfluss der mitochondrialen Fe/S-Cluster Biogenese auf die Aktivität belegen (Li *et al.* 2012). Das in der Vakuole gespeicherte Eisen kann bei Eisenmangel der Zellen über einen divalenten Metallionen-Transporter (Smf3) sowie über ein zur Plasmamembran homologes System wieder zur Verfügung gestellt werden. Das homologe System besteht aus der Metalloreduktase (Fre6) und dem Komplex aus Ferroxidase (Fet5) und Permease (Fth1) (Kosman 2010).

### 1.3 Die Rolle der Mitochondrien im Eisenmetabolismus

In den Mitochondrien wird Eisen in Mono-/Di-Eisen-Proteine, in den essentiellen Cofaktor Häm, und über die ISC-Maschinerie in Fe/S-Cluster Proteine eingebaut.

Ionen und polare kleine Moleküle können zwar die äußere mitochondriale Membran mit Hilfe der Porine durchqueren, jedoch ist die innere Membran nicht permeabel. Ihr Transport über die mitochondriale Innenmembran wird durch spezifische Transportproteine, wie z.B. den mitochondrialen Carrier, durchgeführt. Intensive Studien zeigten, dass Eisenionen hauptsächlich über den mitochondrialen Carrier Mrs4 und dessen Paralog Mrs3 importiert werden (Froschauer *et al.* 2009, Muhlenhoff *et al.* 2003b). Dabei wird auch ein intaktes Membranpotenzial ( $\Delta\psi$ ) benötigt (Lange *et al.* 1999).

Importiertes Eisen wird zum einen für die Synthese des essentiellen Cofaktors Häm (Fe-Protoporphyrin IX; s. Abb. 1-1) benötigt. Hierzu katalysiert die Ferrochelatase die Insertion von  $\text{Fe}^{2+}$  in Protoporphyrin IX, welches der letzte Schritt in der Häm-Biosynthese ist (Abb. 1-3). Häm ist essentiell für aerobe Organismen und spielt eine entscheidende Rolle in

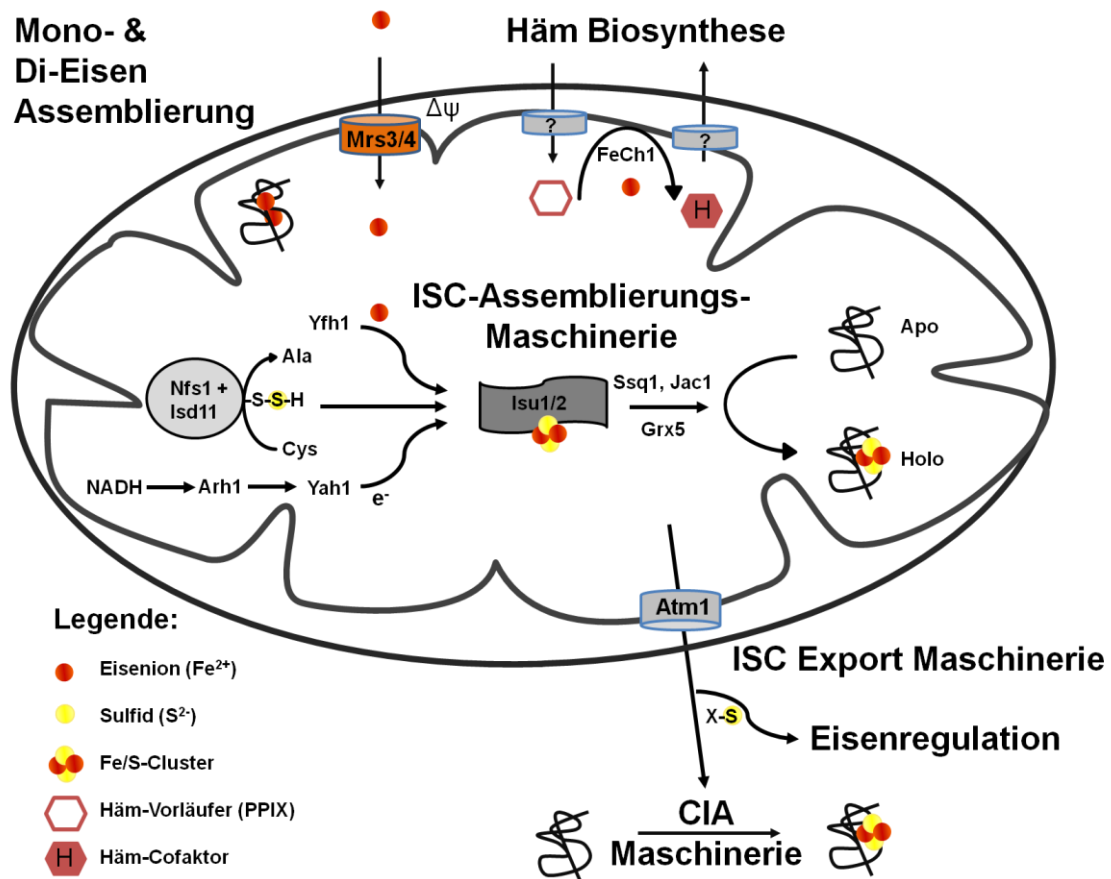
vielen physiologischen Prozessen, wie Sauerstofftransport, Respiration und Signaltransduktion. Bis auf wenige Ausnahmen wird Häm in Eukaryoten in acht konservierten, enzymatischen Schritten aus Glycin, Succinyl-CoA und Eisen synthetisiert. In diesem Häm-Syntheseweg sind der erste und die letzten drei Schritte in den Mitochondrien lokalisiert, während die übrigen im Cytosol stattfinden. Die Intermediate, wie z.B. Porphyrin, müssen daher die mitochondrialen Membranen durchqueren, wobei Succinyl-CoA direkt über den Citratzyklus bereitgestellt wird. Über die transportierenden Proteine in den mitochondrialen Membranen ist bisher nur wenig bekannt. Eine mögliche Beteiligung von mitochondrialen Carriern am Import ist denkbar. Ebenfalls konnten noch keine Transporter für den Häm-Vorläufer Porphyrin oder für den Export von Häm ins Cytosol identifiziert werden. Eine mögliche Funktion des ABC-Transporters ABCB10 im Häm-Export wäre denkbar, da dieser mit der Ferrochelatase interagiert und in der Maus essentiell für die Erythropoese, die Bildung und Entwicklung der Erythrozyten, ist (Chen *et al.* 2010, Hyde *et al.* 2012). Jedoch konnten noch keine Daten für Orthologe in *S. cerevisiae* geliefert werden.

Des Weiteren wird importiertes Eisen für die Assemblierung von Fe/S-Clustern (ISC) verwendet. Dies erfolgt über die ISC-Assemblierungs-Maschinerie, die in zwei Hauptschritte untergliedert wird, einer transienten *de novo* Assemblierung des Fe/S-Clusters auf ein Gerüstprotein und dem anschließenden Transfer auf ein Apo-Zielprotein. Jeder dieser Schritte benötigt weitere Proteine und Cofaktoren, die spezielle biosynthetische Teilreaktionen initiieren (Abb. 1-3) (Lill *et al.* 2012).

Im ersten Schritt, wird der Schwefel mittels des Cysteindesulfurase-Komplexes Nfs1-Isd11 bereitgestellt. Als Schwefelquelle wird L-Cystein zu L-Alanin umgesetzt (Zheng *et al.* 1994). Dabei wird Schwefel in Form eines Persulfids an das Enzym gebunden und kann auf ein weiteres Protein übertragen werden, ohne dass es als freies Ion in der Lösung vorliegt. Für die Reduktion von  $S^0$  (Zustand im Cystein) zu  $S^{2-}$  (Zustand im Fe/S-Cluster) ist ein Elektronentransfer vom Reduktionsäquivalente über das Ferredoxin Yah1 und der Ferredoxinreduktase Arh1 erforderlich (Lange *et al.* 2000, Li *et al.* 2001a). Mit Bereitstellung des Sulfid- und des Eisenions wird ein transienter Fe/S-Cluster auf das Gerüstprotein Isu1/2 zusammengefügt (Garland *et al.* 1999). Im Gegensatz zum Schwefel ist die Herkunft des Eisenions trotz intensiver Forschung immer noch unbekannt. Fest steht, dass das Eisen, analog zum Schwefel, in gebundener Form unter strenger Regulierung auf Isu1/2 übertragen wird. Es gibt Hinweise darauf, dass das Frataxinhomolog Yfh1 eine Rolle spielen könnte (Muhlenhoff *et al.* 2003a). Vom Gerüstprotein Isu1/2 aus erfolgt im zweiten Schritt der Transfer des Fe/S-Clusters in die Zielproteine. Vermittelt wird dieser Transfer mit Hilfe von speziellen Proteinfaktoren wie zum Beispiel dem Chaperonsystem



Ssq1 und Jac1 sowie dem Glutaredoxin Grx5 (Abb. 1-3) (Dutkiewicz *et al.* 2006, Muhlenhoff *et al.* 2003a, Uzarska *et al.* 2013).



**Abb. 1-3 Schematischer Überblick über den mitochondrialen Eisenmetabolismus.** Eisen wird über die mitochondrialen Carrier Mrs3/4 (humanes Mitoferrin) in die Matrix aufgenommen. Dort wird Eisen für die Synthese des essentiellen Cofaktors Häm, zur Insertion in Eisen-bindende Proteine und zur Fe/S-Cluster (ISC) Biogenese verwertet. Im letzten Schritt der Häm-Biogenese katalysiert die Ferrochelatase (FeCh1) die Insertion von  $\text{Fe}^{2+}$  in Protoporphyrin IX. Über den Import der Ausgangsmoleküle sowie den Export des Häm-Cofaktors ist nur wenig bekannt. Bei der ISC-Assemblierung wird im ersten Schritt der Schwefel über den Cystein-Desulfurasekomplex Nfs1-Isd11 von Cystein abgespalten. Mit Hilfe von NADH und der Elektronentransferkette Yah1-Arh1 (humanes FDX1/2-FDXR) wird aus dem  $\text{S}^0$  das benötigte  $\text{S}^{2-}$ . Die Synthese des Fe/S-Clusters aus reduziertem Schwefel und Eisenionen erfolgt auf dem Gerüstprotein Isu1/2 (humanes ISCU). Der Fe/S-Cluster wird dann mit Hilfe von weiteren Proteinfaktoren wie Ssq1, Jac1 und Grx5 (humanes GRP75 und GLRX5) auf das Apo-Zielprotein transferiert. Die ISC-Assemblierungs- sowie die ISC-Export-Maschinerie sind auch entscheidend für die Maturierung extra-mitochondrialer Proteine aufgrund der postulierten Atm1-Funktion (humanes ABCB7) im Export einer unbekannten Schwefel-haltigen Komponente X-S. Diese Komponente hat sowohl auf die CIA Maschinerie, auf die Maturierung von Grx3/4 (humanes Picot), als auch auf die Eisenregulation Auswirkungen. Nähere Details zum mitochondrialen Eisenmetabolismus sind im Text enthalten.

In Eukaryoten kommt neben der mitochondrialen ISC-Assemblierungs- noch eine ISC-Export-Maschinerie vor. Die Funktionalität der beiden Maschinerien ist dabei entschei-

dend für die Maturierung jeglicher extra-mitochondrialer Fe/S-Proteine. Für den ABC-Transporter Atm1, als zentrale Komponente der ISC-Export Maschinerie, wurde eine Funktion im Export einer Schwefel-haltigen Komponente (X-S) postuliert (Kispal *et al.* 1999, Miao *et al.* 2009). Diese Komponente wird u.a. von der CIA-Maschinerie für die Maturierung cytosolischer und nukleärer Fe/S-Proteine benötigt (Lill *et al.* 2012). Trotz der Unterschiede in der Lokalisation gelten auch in der CIA-Maschinerie die gleichen oben beschriebenen generellen Prinzipien für die Fe/S-Cluster Biosynthese (Netz *et al.* 2013).

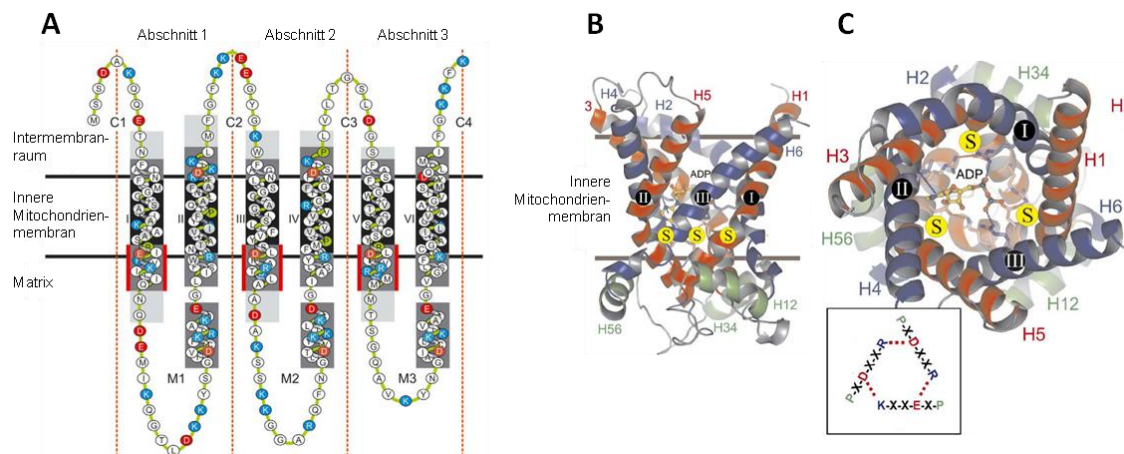
Beide ISC-Maschinerien der Mitochondrien sind auch entscheidend für die Eisenregulation, sowohl unter Eisenmangel als auch unter Eisenüberschuss. Indirekt sind sie ebenfalls essentiell für die Stabilität der nukleären DNA. In einer Studie von Veatch *et al.* konnte gezeigt werden, dass Defekte in der mitochondrialen Fe/S-Cluster Biogenese zur zellulären Krise aufgrund nukleärer Genominstabilität führt, da jegliche Fe/S-Cluster Maturierungen abhängig von den Mitochondrien sind und essentielle Fe/S-Proteine im DNA-Metabolismus involviert sind (Veatch *et al.* 2009). Der unmittelbare Verlust der mitochondrialen DNA kann ebenfalls zur Genominstabilität führen, da dies das Membranpotenzial senkt, womit es zum verringerten Eisenimport und somit zur Beeinträchtigung der ISC-Maschinerien kommt.

### 1.3.1 Die Rolle der mitochondrialen Carrier im Eisenmetabolismus

Die mitochondrialen Carrier Mrs3 und Mrs4 (humanes Mitoferrin) spielen eine zentrale Rolle in der mitochondrialen Eisenversorgung (Foury & Roganti 2002, Muhlenhoff *et al.* 2003b, Paradkar *et al.* 2009, Shaw *et al.* 2006).

Proteine der mitochondrialen Carrier Familie (MCF) bilden eine große Gruppe an strukturell-ähnlichen Proteinen, die nur in den Eukaryoten vertreten sind (Palmieri 1994, Kunji & Robinson 2006). Bei den humanen Vertretern der mitochondrialen Carrier spricht man auch von der mitochondrialen SLC25-Familie (*solute carrier family 25*) (Gutierrez-Aguilar & Baines 2013). Die meisten MCF-Vertreter in *S. cerevisiae* sind integrale Proteine der inneren Mitochondrienmembran und katalysieren den Transfer verschiedenster Metaboliten und Cofaktoren zwischen dem Cytosol und den Mitochondrien. Lediglich ein Mitglied der Hefe-MCF wurde in den Peroxisomen lokalisiert, wo es den Austausch von ATP und ADP vermittelt (Palmieri *et al.* 2001). Typische mitochondriale Carrier (MC) haben ein Molekulargewicht von ~ 35 kDa, bestehen aus sechs membranspannenden Segmenten

und sind strukturell dreigeteilt (Abb. 1-4). Jeder dieser drei Abschnitte besteht aus rund 100 Aminosäuren, die mit Hilfe von zwei hydrophoben  $\alpha$ -Helices die Membran durchziehen. Charakteristisch für die Familie der MC ist das Sequenzhomologie-Motiv P-X-D/E-X-X-K/R-X-K/R, das in allen drei Abschnitten vorkommt (Abb. 1-4) (Saraste & Walker 1982). Dieses Motiv erleichterte die Genom-weite Suche nach Mitgliedern der MCF und führte zur Identifizierung von 35 ORFs (*open reading frames*) in *S. cerevisiae* und in der humanen SLC25-Familie von 53 ORFs.



**Abb. 1-4 Struktureller Aufbau der mitochondrialen Carrier am Beispiel des ADP/ATP-Carriers. (A)** Schematische Darstellung des dreiteiligen Aufbaus von mitochondrialen Carriern. **(B)** Seitliche Ansicht und **(C)** Ansicht von oben auf die Kristallstruktur des ADP/ATP-Carriers. (H- Helix; gelber Kreis mit S – Salzbrücken, schwarzer Kreis mit I-III – putative Substratbindungsstellen, sog. *contact sites*) (Modifiziert nach Kunji 2004, Kunji & Robinson 2006)

Bei den meisten dieser Carrier konnte das Substrat über die rekombinante Expression in *E. coli* und einer anschließenden Rekonstituierung in Membranvesikel zugeordnet werden (Palmieri *et al.* 2006). Die Substrate der MC sind äußerst divers, und können von Protonen (UCPs; *uncoupling protein*) (Aquila *et al.* 1985) bis hin zu größeren Molekülen wie ATP (ADP/ATP-Carrier) reichen (Aquila *et al.* 1982). Aber auch Phosphat, Citrat, Fumarat/Succinat oder Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) werden von den MC transportiert (Kunji & Robinson 2006).

Insbesondere Nukleosid-(deoxy)-Triphosphate werden innerhalb der Mitochondrien für die DNA und RNA Synthese benötigt. Jedoch werden Nukleosid-(deoxy)-di-Phosphate außerhalb der Mitochondrien synthetisiert und auch die Nukleosid-Di-Phosphat Kinase (Ynk1) und die Ribonukleotid-Reduktasen (Rnr1-4) sind außerhalb der mitochondrialen Innenmembran lokalisiert (Amutha & Pain 2003, Kumar *et al.* 2002, Yao *et al.* 2003). Meh-

rere Transporter für den Import von Purinen wurden identifiziert (Adrian *et al.* 1986, Kolarov *et al.* 1990, Lawson & Douglas 1988, Voza *et al.* 2004). Keiner davon ist aber in der Lage auch Pyrimidine zu importieren. In der Studie von Marobbio *et al.* (2006) konnte schließlich der Carrier Rim2 als Pyrimidin-(deoxy)-Di- und -Triphosphat Transporter identifiziert werden.

Die *MRS3* und *MRS4* Gene wurden zunächst in einem Screen für *multi-copy suppressors* eines mitochondrialen RNA-Splicing (MRS) Defekts identifiziert (Van Dyck *et al.* 1995). Die Überexpression von *MRS3* oder *MRS4* suppressierte dabei den Phänotyp, der durch die Deletion von *MRS2*, der einen  $Mg^{2+}$ -Transporter kodiert, ausgelöst wurde (Waldherr *et al.* 1993, Kolisek *et al.* 2003). Mrs3 (314 Aminosäuren) und Mrs4 (304 Aminosäuren) weisen zu 76 % identische und zu 87 % ähnliche Aminosäurereste auf. Die ersten Hinweise auf eine Funktion von Mrs3 und Mrs4 im mitochondrialen Metalltransport kamen durch Deletions- und Überexpressionsversuche von *MRS3/4* in der Frataxin-Deletionsmutante auf (*yfh1Δ* Zellen) (Foury & Roganti 2002). Darüber hinaus sind Mrs3/4 entscheidend für die mitochondriale Eisenversorgung unter Eisenmangelbedingungen (Muhlenhoff *et al.* 2003b). Ein weiteres Indiz in Richtung dieser Funktion zeigte sich bei der Co-Induktion von *MRS4* in der Aft1/2-überexprimierenden Mutante (Rutherford & Bird 2004). Verifiziert wurden diese Hinweise bei der *in vitro* Charakterisierung von Mrs3/4 im Zusammenhang mit dem Eisenmetabolismus in *S. cerevisiae*. Dabei zeigte sich, dass Mrs3/4 in der Lage ist  $Fe^{2+}$  direkt über die innere Mitochondrienmembran zu transportieren (Froschauer *et al.* 2009).

Mitoferrin1 (Mfrn1; SLC25A37) und Mitoferrin2 (Mfrn2; SLC25A28), die homologen Carrier in Vertebraten, sind in der Lage die Defekte einer *MRS3/4* Deletion in der Hefe zu kompensieren (Shaw *et al.* 2006). Die Expression von Mfrn1 ist entscheidend für die Erythropoese. Mfrn2 hingegen ist der ubiquitär exprimierte Carrier in allen Zellen der Vertebraten, auch wenn Transkripte von Mfrn1 in nicht-erythroiden Zellen in geringen Mengen vorhanden sind (Shaw *et al.* 2006). Die Deletion von Mfrn1 in der Maus führt zur embryonalen Letalität (Troade *et al.* 2011). Der Verlust von Mfrn1 im Zebrafisch und in erythroiden Zellen resultiert in einer hypochromen Anämie aufgrund der Beeinträchtigung der Eisenversorgung der hämatopoetischen Zellen und somit einer Hemmung der Häm-Synthese (Shaw *et al.* 2006).

Im Vergleich dazu sind die *mrs3/4Δ* Hefezellen, wenn auch eingeschränkt, überlebensfähig. Die Deletion der Carrier verursacht eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Eisenversorgung und somit eine Verringerung der Fe/S-Cluster Biogenese. Dies wiederum vermittelt die Aktivierung von Aft1/2. Aft1/2 kann die Expression der Eisentransporter in

der Plasmamembran erhöhen und somit auch die Eisenionen-Konzentration im Cytosol. Dies rettet das Wachstum der Hefezelle aber nur bei ausreichender Eisensupplementation. Bei Eisenmangel im Medium ist die *MRS3/4* Deletion letal. Daraus lässt sich schließen, dass es bei erhöhter Eisenkonzentration im Cytosol zu einer alternativen mitochondrialen Eisenaufnahme unabhängig von *Mrs3/4* kommen muss.

## 1.4 Regulation der Eisenhomöostase in *Saccharomyces cerevisiae*

*S. cerevisiae* reguliert seinen Eisenmetabolismus hauptsächlich transkriptionell. Unter Eisen-limitierenden Bedingungen akkumuliert der Transkriptionsfaktor Aft1 und dessen Paralog Aft2 im Nukleus, wo es die Expression von Genen des sog. Eisenregulons aktiviert. Zum Eisenregulon gehören Gene der zellulären Eisenaufnahme wie *FET3* und *FIT3*, aber auch Gene für die intrazelluläre Eisenverteilung, wie z.B. *MRS4*, für die mitochondriale Eisenaufnahme (Kaplan & Kaplan 2009, Philpott & Protchenko 2008). Ebenfalls unter der Kontrolle von Aft1/2 steht die Expression von *CTH2*. Cth2, zusammen mit Cth1, bildet eine zusätzliche posttranskriptionelle Ebene der Regulation bei Eisenmangel. Cth1/2 binden direkt an AU-reichen Elemente (AREs) in der 3'UTR (3' *untranslated region*) von mRNAs. Solche AREs sind vor allem in Komponenten Eisen-vermittelter Prozesse, wie z.B. des Citratzyklus und der Atmungskette vorhanden, und induzieren deren Abbau (Abb. 1-5) (Puig *et al.* 2008). Die mRNA von *Ccc1* wird ebenfalls auf diesem Weg abgebaut, wodurch der Eisenimport in die Vakuole reprimiert wird (Puig *et al.* 2005).

Zur Erfassung des Eisenstatus in der Zelle benötigt Aft1/2 die regulatorischen Proteine Fra1 und Fra2, sowie Grx3/4. Diese sind essentiell für die Deaktivierung von Aft1/2 bei ausreichender zellulärer Eisenkonzentration (Kumanovics *et al.* 2008, Ojeda *et al.* 2006, Pujol-Carrion *et al.* 2006, Ueta *et al.* 2012). Der molekulare Mechanismus der Inaktivierung von Aft1 ist aber noch nicht vollständig aufgeklärt.

Als zentraler Umschlagplatz für Eisen sind die Mitochondrien ebenfalls entscheidend an der Regulation der zellulären Eisenhomöostase beteiligt. Hierbei spielen die mitochondrialen ISC-Systeme eine zentrale Rolle. Ist einer ihrer Komponenten nicht funktionsfähig oder fehlt ganz, kommt es zu Aktivierung von Aft1 und Aft2 und somit zu einer erhöhten Eisenaufnahme. Das überschüssige aufgenommene Eisen akkumuliert in den Mitochondrien (Muhlenhoff *et al.* 2002b). Dies ist ein unphysiologischer Prozess, da üblicherweise

die Vakuole als Eisenspeicher fungiert. Im Gegensatz zur ISC-Maschinerie spielt in *S. cerevisiae* die Häm-Biosynthese keine direkte Rolle bei der Regulation des Eisenmetabolismus (Ihrig *et al.* 2010).

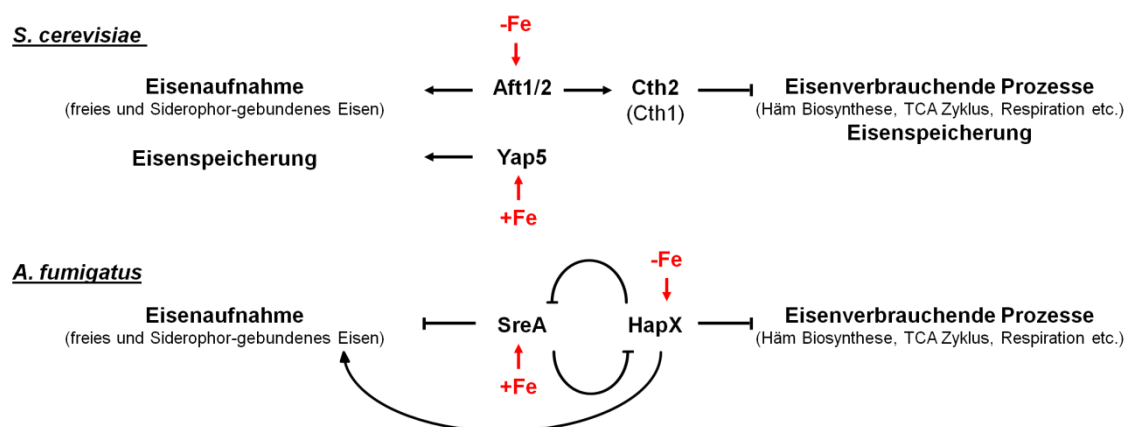
Interessanterweise kommt der Fe/S-Cluster Biogenese auch eine entscheidende Bedeutung bei der Anpassung an Hocheisenbedingungen zu. Dabei detoxifiziert der vakuoläre Metallimporter Ccc1 die Zelle indem das überschüssige cytosolische Eisen in die Vakuole transportiert wird. Somit ist Ccc1 essentiell für das Überleben der Hefezelle unter hohen Eisenkonzentrationen (Li *et al.* 2001b).

Genetische Studien zeigten, dass der bZIP-Transkriptionsfaktor Yap5 bei Eisenüberschuss u.a. die Expression von *CCC1* aktiviert (Li *et al.* 2008, Li *et al.* 2011). Ebenfalls zeigte Li *et al.* (2011) einen Einfluss der mitochondrialen Fe/S-Cluster Biogenese auf die Aktivierung von Yap5. Ähnlich zur Deaktivierung von Aft1/2 ist auch die Funktion von Yap5 von einer funktionellen ISC-Assemblierungs- und Export-Maschinerie abhängig. Dabei stellt sich die Frage, ob Yap5 *per se* einen regulatorischen Fe/S-Cluster koordiniert oder ob es, ähnlich wie Aft1/2, von einem Fe/S-Protein wie z.B. Grx3/4 reguliert wird.

Yap5 ist ein Hefe-spezifischer bZIP- (basischer Leucin-Zipper-) Transkriptionsfaktor der AP1-Familie (*yeast activator protein* - Yap). AP-1 Proteine gehören zu den eukaryotischen bZIP-Transkriptionsfaktoren, eine der größten Familien von Transkriptionsfaktoren, die von der Hefe bis zum Menschen konserviert sind. Dazu zählen die human Onkogene c-Jun und c-Fos oder aber auch der konventionelle Hefe AP-1 Faktor Gcn4, als Aktivator der Aminosäuren-Biosynthesen. Allen Faktoren gemeinsam ist die bZIP-Domäne (Landschulz *et al.* 1988). Diese besteht zum einen aus einer hochkonservierten Region von etwa dreißig Aminosäuren, die einen hohen Anteil an basischen Aminosäuren aufweist. Über die positiven Ladungen findet der Kontakt zu den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA statt (Ellenberger *et al.* 1992). Zum anderen befindet sich C-terminal davon die konservierte "Leucin-Zipper" Domäne (O'Shea *et al.* 1991). In diesem Aminosäureabschnitt befindet sich charakteristischerweise an jeder siebten Position die Aminosäure Leucin. Durch die  $\alpha$ -helikale Struktur organisieren sich damit alle hydrophoben Leucin-Reste auf einer Seite. Kommen zwei dieser amphipatischen  $\alpha$ -helikalen Domänen aus zwei Proteinen in Kontakt, können sich transkriptionell aktive Komplexe aus Homo- oder Hetero-Dimeren bilden. Möglicherweise wird durch die Reißverschlussartige (*zipper*) Strukturanordnung die basische DNA-Bindedomäne so positioniert, dass sie sich Y-förmig ausrichten kann und so den engen Kontakt zu den Basen herstellt (Vinson *et al.* 1989, Fujii *et al.* 2000). Die DNA-Bindung der bZIP-Transkriptionsfaktoren erfolgt an einer spezifischen kurzen DNA-Sequenz. Diese wird als AP-1 bzw. im Fall der Yap-Familie als

*Yap response element* (YRE: TTAC/GTAA) bezeichnet (Fernandes *et al.* 1997). Die *S. cerevisiae* Yap-Familie besteht aus acht Mitgliedern, die in der transkriptionellen Antwort auf oxidativen und nitrosativen Stress (Yap1), Cadmium und Arsen Stress (Yap1, Yap2 und Yap8), osmotischen Stress (Yap4 und Yap6) und Eisenüberschuss (Yap1 und Yap5) entscheidend sind (Herrero *et al.* 2008, Rodrigues-Pousada *et al.*).

Orthologe Transkriptionsfaktoren von Yap1 konnten in den verschiedensten Organismen identifiziert werden, darunter zählen *Schizosaccharomyces pombe* Pap1 (Toda *et al.* 1991), *Candida albicans* Cap1 (Billard *et al.* 1997) und *Ustilago maydis* Yap1 (Molina & Kahmann 2007). Yap5 Orthologe sind dagegen nur in den *Saccharomyceten* vertreten. Generell finden sich Homologe zu Aft1/2, Cth1/2 und Yap5 vor allem in der *Saccharomycetaceae*-Familie. Dagegen erfolgt in den meisten Pilzen, wie z.B. den Schimmelpilzen, die Eisen-Regulation über den GATA-Faktor SreA und den bZIP-Transkriptionsfaktor HapX (Abb. 1-5). Beim opportunistisch pathogenen Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* ist HapX der Hauptregulator der Eisenmangeladaptation. In diesem Zusammenhang stellt HapX durch Repression des Eisenverbrauchs und gleichzeitiger Aktivierung der Siderophor-vermittelten Eisenaufnahme einen essentiellen Virulenzfaktor dar, da die Eisenversorgung eines Pathogens eine zentrale Komponente für die Ausbreitung in seinem Wirt ist (Haas 2012). Dementsprechend ist das Fernhalten von Eisen durch den Wirt eine wichtige Verteidigungsstrategie gegen Infektionen. Bei genügender Eisenversorgung reprimiert SreA die Eisenaufnahme. Zusätzlich hemmen sich die beiden Transkriptionsfaktoren in einer negativen Rückkopplungsschleife gegenseitig (Abb. 1-5).



**Abb. 1-5 Schematischer Vergleich der Eisenregulation zwischen *S. cerevisiae* und *A. fumigatus*.** In *S. cerevisiae* wird die Anpassung an Eisenmangel und -überschuss über die transkriptionellen Aktivatoren Aft1/2 und Yap5 reguliert. Dagegen sind im Schimmelpilz *A. fumigatus* die Repressoren SreA und HapX entscheidend. Diese beiden Transkriptionsfaktoren regulieren sich in einer negativen Rückkopplungsschleife gegenseitig. (Modifiziert nach Haas *et al.* 2008)

## 1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Diese Arbeit beschäftigt sich mit zwei zentralen Aspekten der zellulären Eisenhomöostase, der mitochondrialen Eisenaufnahme und der Regulation der Anpassung an toxische Eisenkonzentrationen. Die Aufrechterhaltung und genaue Kontrolle der Eisenhomöostase ist essentiell zur Vermeidung von zellschädigenden Reaktionen, die zu Krankheiten wie der Hämochromatose (Eisenspeicherkrankheit) und zur Bildung von vermehrten ROS führen können. Die Anhäufung von ROS wiederum kann auf indirekte Weise eine Vielzahl an Krankheiten, wie z.B. die Friedrich Ataxie oder die Parkinson Erkrankung verschlimmern (Armstrong *et al.* 2010, Weinreb *et al.* 2013).

Mitochondrien sind als Ort der Synthese von Häm und Fe/S-Clustern zentral für den zellulären Eisenmetabolismus von Bedeutung und damit essentiell für das Überleben einer Zelle. Dementsprechend ist die Aufnahme von Eisen in die Mitochondrien ein zentraler Aspekt des zellulären Eisenhaushalts. Jedoch ist die Deletion der Gene der bisher bekannten mitochondrialen Eisenimporter Mrs3 und Mrs4 in der Hefezelle nicht letal. Die *mrs3/4Δ* Hefezellen sind in der mitochondrialen Eisenversorgung beeinträchtigt und zeigen eine Verringerung in der Fe/S-Cluster und Häm Biogenese. Allerdings sind die Zellen überlebensfähig, solange eine ausreichende Eisensupplementation von außen vorliegt. Dies bedeutet, dass noch ein alternatives mitochondriales Eisenaufnahme-System existieren muss. In diesem Zusammenhang konnte ein *high-copy suppressor* Screen in *mrs3/4Δ* Zellen zeigen, dass die Überexpression des Pyrimidinnukleotid-Transporters Rim2 in der Lage ist, den Wachstumsdefekt von *mrs3/4Δ* Zellen in Eisenmangelmedium zu supprimieren (Li *et al.* 2010). Dabei stellt sich die Frage, ob Rim2 ein physiologisch bedeutsamer Eisentransporter in der Hefe ist. Darüber hinaus ist von Interesse wie der gut charakterisierte Pyrimidinnukleotid-Transporter Rim2 eine weitere Funktion im Eisenmetabolismus ausüben kann. Zur Beantwortung dieser Fragen wurde in Kooperation mit einer Wiener Arbeitsgruppe die mögliche Funktion des Rim2 in der mitochondrialen Eisenaufnahme untersucht. Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführte Untersuchung fokussierte sich auf die *in vivo* Charakterisierung der Rolle von Rim2 im Eisenmetabolismus von *S. cerevisiae*. Die parallelen Arbeiten von der Wiener Arbeitsgruppe waren hingegen auf der Charakterisierung der Transporteigenschaften von Rim2 *in vitro* fokussiert.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung des bZIP-Transkriptionsfaktors Yap5, der eine wichtige Rolle bei der Anpassung von *S. cerevisiae* an toxisch hohe Eisenmengen spielt. Eine regulierte intrazelluläre Verteilung und das Erfassen des Eisenstatus sind essentielle Aspekte eines ausgeglichenen Eisenhaushalts.



Die Adaption an erhöhte Eisenkonzentrationen erfolgt über die Speicherung des freien Eisens in der Vakuole. Der Transport von überschüssigem Eisen aus dem Cytosol in die Vakuole ist durch den divalenten Metallionentransporter Ccc1 katalysiert. Die transkriptionelle Regulation von *CCC1* ist abhängig vom bZIP-Transkriptionsfaktor Yap5. Wie Yap5 den Eisenstatus der Zelle sensorisch erfasst, ist allerdings unklar. Da die mitochondriale ISC-Maschinerie in die Regulation von Yap5 eingreift, war es naheliegend der Frage nachzugehen ob Yap5 ein Fe/S-Protein ist und über einen regulatorischen Fe/S-Cluster als Sensor die Expression von *CCC1* reguliert.

Evolutionär sind die Transkriptionsfaktoren Aft1/2 und Yap5 zwar vor allem in der Gruppe der *Saccharomycetaceae* vertreten. Allerdings bestehen bei den beiden bZIP-Transkriptionsfaktoren Yap5 und HapX nicht nur Ähnlichkeiten in den DNA-Bindedomänen, sondern auch in einem Cystein-reichen Motiv in den jeweiligen Aktivator-domänen. Bei diesem Motiv könnte es sich daher um ein generelles Eisen-reguliertes Motiv handeln. In diesem Zusammenhang war die parallele Untersuchung von HapX von Interesse. Hierbei wurde untersucht, ob HapX ein Eisen-bindendes Protein ist, und ob dieses Eisen in Form eines Fe/S-Clusters gebunden wird.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Die Rolle des mitochondrialen Carriers Rim2 im Eisenmetabolismus

Die Eisenaufnahme in die Mitochondrien ist von essentieller Bedeutung für die gesamte zelluläre Eisenhomöostase, da in diesem Organell sowohl die letzten Schritte der Häm Biosynthese als auch die ISC-Assemblierungs- und Export-Maschinerie lokalisiert sind (Atkinson & Winge 2009, Hamza & Dailey 2012, Lill *et al.* 2012, Richardson *et al.* 2010). Frühere Studien zeigten die hochkonservierten Carrier Mrs3 und Mrs4 (in Vertebraten Mitoferrin1 und Mitoferrin2) als mitochondriale Eisentransporter, deren Funktion insbesondere unter Eisenmangel entscheidend ist (Foury & Roganti 2002, Muhlenhoff *et al.* 2003b, Paradkar *et al.* 2009, Shaw *et al.* 2006). Allerdings führt die kombinierte Deletion von *MRS3* und *MRS4* (*mrs3/4Δ*) in der Hefe zu keinem letalen Phänotyp. Erst unter Eisenmangel wird das Wachstum und der Eisenmetabolismus der *mrs3/4Δ* Zellen stark beeinträchtigt. Dies wiederum lässt auf die Existenz weiterer Eisentransporter schließen, die in der Lage sind, unter ausreichender Eisensupplementierung, Eisen in die Mitochondrien zu transportieren.

Literaturrecherchen sowie die langjährige Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Schweyen<sup>1</sup> und Frau Dr. Wiesenberger lenkten die Untersuchungen auf den, als Pyrimidin-Transporter charakterisierten, Carrier Rim2 (Mrs12) (Marobbio *et al.* 2006). Ursprünglich wurde dieser Carrier in einem genetischen Screen als *multi-copy suppressor* von *mrs2Δ* Zellen isoliert (Van Dyck *et al.* 1995).

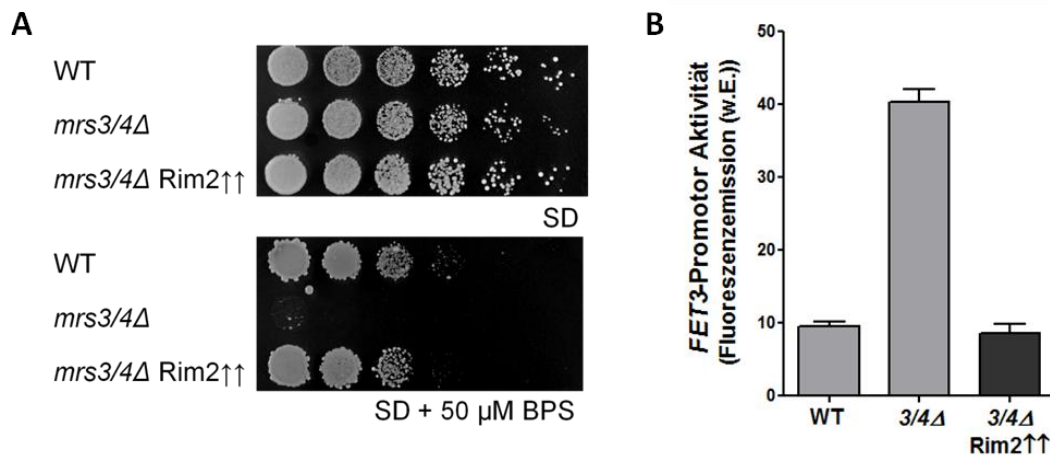
In einem weiteren *high-copy suppressor* Screen zeigte sich, dass die Überexpression von *RIM2* ebenfalls in der Lage ist, den letalen Wachstumsdefekt von *mrs3/4Δ* Zellen im Eisenmangelmedium zu supprimieren (Lin *et al.* 2011). Dagegen sind andere Carrier, wie z.B. der Phosphattransporter Mir1 und Pic2 oder der S-Adenosylmethionin Transporter Pet8/Sam5, nicht fähig, den Eisenmangel-Phänotyp von *mrs3/4Δ* Zellen zu komplementieren (Froschauer *et al.* 2013). Dabei stellte sich die Frage, wie ein gut charakterisierter Pyrimidin-Transporter eine Funktion im Eisenmetabolismus ausüben könnte, und / oder ob Rim2 einen dritten Eisentransporter der Hefe darstellt. Zur Klärung dieser Möglichkeiten wurden die Effekte auf den Eisenmetabolismus von *mrs3/4Δ* Zellen untersucht, in denen *RIM2* entweder überexprimiert oder deletiert worden war.

---

<sup>1</sup> verstorben

### 2.1.1 Die Überexpression von *RIM2* komplementiert die Häm- und Fe/S-Cluster Synthesedefekte in *mrs3/4Δ* Zellen

Zunächst wurde überprüft, ob der Befund von Rim2 als „*high-copy suppressor*“ von *mrs3/4Δ* Zellen bestätigt werden konnte und ob dieser auf einen Defekt im Eisenmetabolismus zurückzuführen ist. Wenn nicht anders vermerkt, wurde in dieser Arbeit standardmäßig der Laborwildtypstamm W303 und dessen isogene Deletionsmutanten verwendet. In der Tat rettete die Überexpression von *RIM2* den Wachstumsdefekt von *mrs3/4Δ* Zellen auf Eisenmangelmedium in Gegenwart des Eisenchelators BPS (Abb. 2-1 A).



**Abb. 2-1 Die Überexpression von *RIM2* rettet den Eisenmangel-Phänotyp von *mrs3/4Δ* Zellen.** (A) WT und die isogenen *mrs3/4Δ* Zellen (*3/4Δ*), mit einem Leervektor oder einem *RIM2* kodierenden Vektor (*Rim2↑↑*), wurden nach exponentiellem Wachstum in Flüssigmedium in einer seriellen Verdünnungsreihe auf Agarplatten mit synthetischen Minimalmedium mit Glucose (SD) mit und ohne BPS Supplementation aufgetragen. Die Platten wurden für 48 h bei 30 °C inkubiert. (B) Die Zellen wie in A wurden zusätzlich mit einem *pFET3-GFP* Konstrukt transformiert und in SD Medium mit 50 μM FAC angezogen. Die Aktivität des Aft1/2-regulierten *FET3*-Promotors wurde über die spezifische GFP-Fluoreszenz ganzer Zellen bestimmt. Fehlerbalken geben den SEM an (n>4).

Die *mrs3/4Δ* Zellen zeigen eine konstitutive Aktivierung des Aft1- und Aft2-abhängigen Eisenregulons. Dieses ist ein Signal für einen Eisenmangel und wird in *mrs3/4Δ* Zellen durch eine Unterversorgung der Mitochondrien mit Eisen hervorgerufen (Muhlenhoff *et al.* 2003b). Experimentell lässt sich dies durch die Plasmid-basierte Expression des *green fluorescent protein (GFP)*, unter der Kontrolle des Aft1/2-induzierbaren *FET3*-Promotors, analysieren (Molik *et al.* 2007). In *mrs3/4Δ* Zellen war die GFP-Fluoreszenz verglichen zum Wildtyp um das Vierfache erhöht. Die Überexpression von *RIM2* unter

Kontrolle des *TetO<sub>7</sub>*-Promotors (*Rim2*↑↑) reduzierte die Expression von *FET3* in *mrs3/4Δ* Zellen auf Wildtyplevel (Abb. 2-1 B).

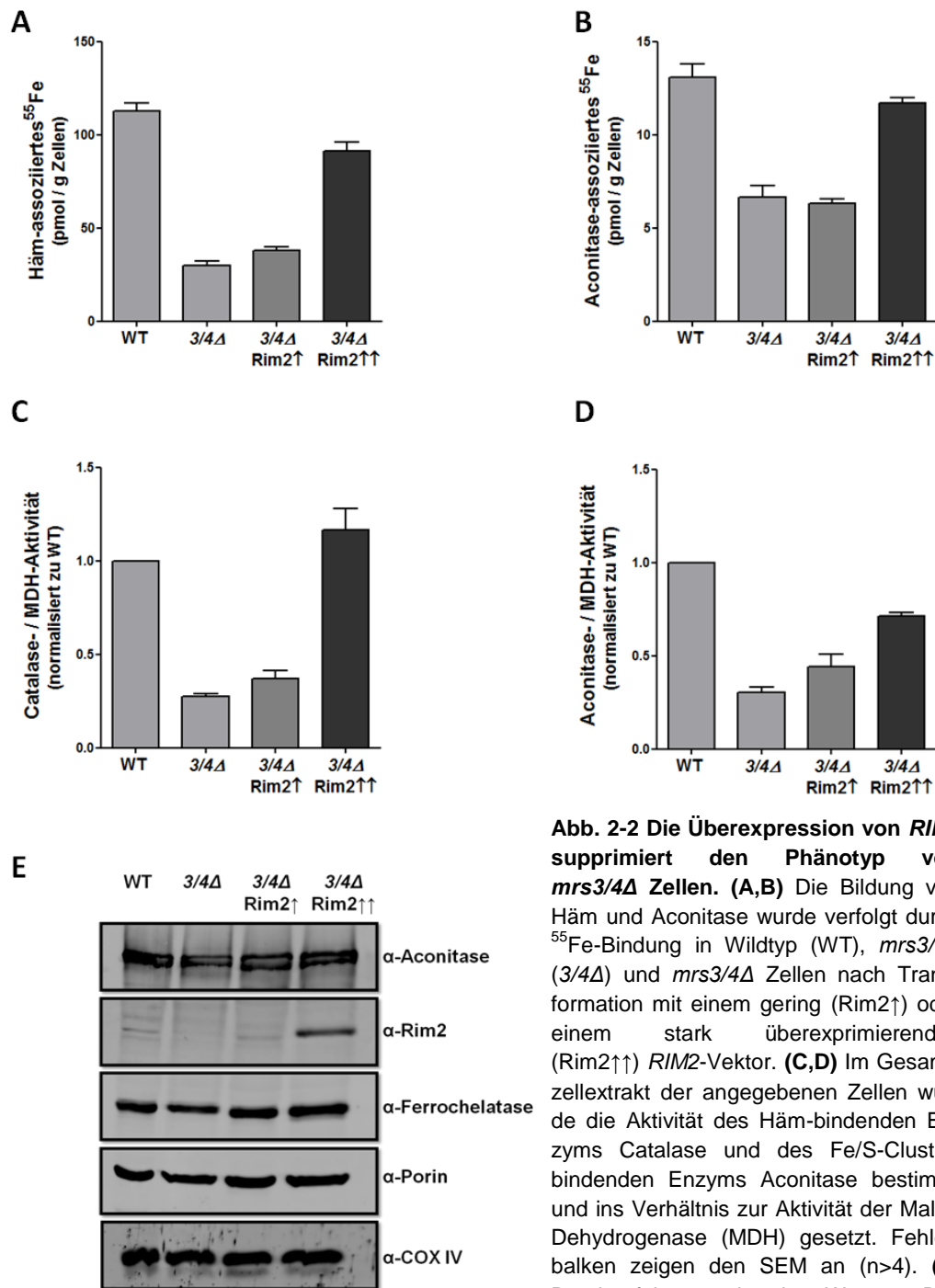
Ein mitochondrialer Eisenmangel aktiviert nicht nur das Eisenregulon, es hat eine generelle Beeinträchtigung der Fe/S-Cluster Biogenese und der Häm-Synthese zur Folge. Diese Defekte können *in vivo* u.a. mittels radioaktiver Markierung mit einem Eisenisotop (<sup>55</sup>Fe) bestimmt werden. Hierzu werden Hefezellen unter niedrigen Eisenkonzentrationen kultiviert und anschließend mit radioaktivem <sup>55</sup>Fe für ca. 2 Stunden inkubiert. Darauf folgend können im Gesamtzellextrakt radioaktiv markiertes Häm mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert oder radioaktiv markierte Fe/S-Proteine über eine Immunpräzipitation gefällt werden. Das *de novo* gebildete <sup>55</sup>Fe-Häm und die neu assemblierten <sup>55</sup>Fe/S-Cluster können im Szintillationszähler quantifiziert werden.

In den *mrs3/4Δ* Zellen sank die <sup>55</sup>Fe-Häm Synthese um 70 % und die Assoziierung der Aconitase mit <sup>55</sup>Fe/S-Clustern auf 50 % des Wertes im Wildtyp (Abb. 2-2 A und B). *Rim2* war in der Lage, diese Defekte der Häm- und Aconitase Synthese zu kompensieren. Jedoch führte nur eine starke Überexpression unter Kontrolle des *TetO<sub>7</sub>*-Promotors, nicht aber unter Kontrolle des natürlichen *RIM2*-Promotors (*CEN* Vektor), zu einer Verbesserung der Synthese Eisen-abhängiger Proteine.

Parallel wurden die Enzymaktivitäten der Aconitase sowie des cytosolischen Häm-bindenden Enzyms Catalase bestimmt (Abb. 2-2 C und D). Vergleichbar zur *de novo* <sup>55</sup>Fe-Assemblierung führt die simultane Deletion der Eisentransporter *Mrs3* und *Mrs4* zu reduzierten Enzymaktivitäten der Aconitase und der Catalase auf ca. 1/3 des Wildtyplevels (Abb. 2-2 C und D). Ebenfalls ähnlich der <sup>55</sup>Fe-Assoziierung bewirkte die leicht erhöhte Expression von *RIM2* keine Verbesserung des *mrs3/4Δ* Phänotyps. Dagegen führte die Überexpression von *RIM2* zur Anhebung der Aktivität der Catalase auf Wildtypniveau und zur Verbesserung der Aconitase-Aktivität auf 70 % des Wildtyps (Abb. 2-2 C und D).

Ein negativer Effekt auf die Bestimmung der Eisen-abhängigen Proteine aufgrund stark unterschiedlicher Proteinlevel wurde durch die Western Blot Analysen ausgeschlossen (Abb. 2-2 E). Demnach stehen die Ergebnisse der Enzymmessungen sowie des Eiseneinbaus in direkter Verbindung mit der Wirkung der *RIM2*-Überexpression.

Die spezifische Rettung des Eisenmetabolismus in *mrs3/4Δ* Zellen durch die Überexpression von *RIM2*, steht im Einklang mit der Arbeit einer anderen Arbeitsgruppe (Lin *et al.* 2011) und deutet auf eine mögliche direkte oder indirekte Funktion von *Rim2* im mitochondrialen Eisentransport hin.



**Abb. 2-2 Die Überexpression von *RIM2* supprimiert den Phänotyp von *mrs3/4Δ* Zellen.** (A,B) Die Bildung von Häm und Aconitase wurde verfolgt durch  $^{55}\text{Fe}$ -Bindung in Wildtyp (WT), *mrs3/4Δ* ( $3/4\Delta$ ) und *mrs3/4Δ* Zellen nach Transformation mit einem gering (Rim2 $\uparrow$ ) oder einem stark überexprimierenden (Rim2 $\uparrow\uparrow$ ) *RIM2*-Vektor. (C,D) Im Gesamtzell-extrakt der angegebenen Zellen wurde die Aktivität des Häm-bindenden Enzyms Catalase und des Fe/S-Cluster-bindenden Enzyms Aconitase bestimmt und ins Verhältnis zur Aktivität der Malat-Dehydrogenase (MDH) gesetzt. Fehlerbalken zeigen den SEM an (n>4). (E) Durchgeführt wurde eine Western Blot Analyse des Zell-extrakts, auf die Anwesenheit der angegebenen Proteine. Porin diente als Ladekontrolle.

Untersuchungen unseres Kooperationspartners lieferten die ersten *in vitro* Daten über den direkten vermittelten Transport von Eisen über die mitochondriale Innenmembran via Rim2. Mit Hilfe sog. submitochondrialer Partikel (SMPs) konnte ein Pyrimidin-spezifischer, konzentrationsabhängiger Co-Import von  $\text{Fe}^{2+}$  und anderen divalenten Metallionen zusammen mit Pyrimidinen nachgewiesen werden (Froschauer *et al.*

2013). Diese Daten legen nahe, dass Rim2 in Anwesenheit von Pyrimidinen divalente Metallionen, inklusive Eisen über die mitochondriale Innenmembran transportiert.

Zusammengefasst sind diese *in vitro* Daten eines Co-Imports von Pyrimidinen zusammen mit Eisenionen konform mit den Resultaten des Wachstumstests auf Eisenmangelmedium, sowie der *in vivo* Experimenten. Die Ergebnisse erklären den spezifischen „*high-copy suppressor*“-Effekt von *RIM2* in der Eisenhomöostase von *mrs3/4Δ* Hefezellen.

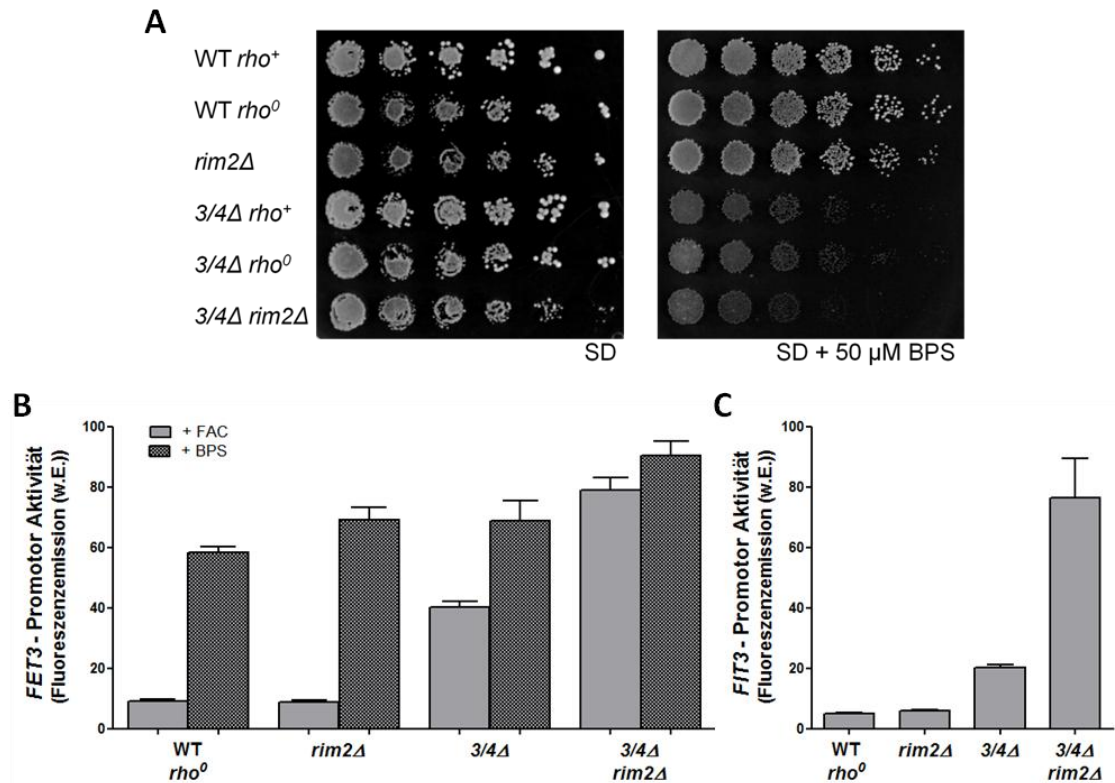
### 2.1.2 *rim2Δ* Zellen haben keinen Fe/S-Custer Synthesedefekt, aber verstärken den Defekt in *mrs3/4Δ* Zellen

Angesichts der komplementierenden Effekte stellt sich die Frage, ob Rim2 eine physiologische Rolle im mitochondrialen Eisentransport hat, oder ob Rim2 nur unter artifiziellen Bedingungen, wie z.B. starker Überexpression, als Eisentransporter fungiert. Hierzu wurden die Auswirkungen der Deletion von *RIM2* allein und in Kombination mit *MRS3/4* auf den Eisenmetabolismus von *S. cerevisiae* untersucht.

Es galt zu berücksichtigen, dass eine Deletion des Pyrimidin-Transporters unweigerlich zum Verlust der mitochondrialen DNA (*rho*<sup>0</sup>) führt. Daraus resultierte der Vergleich von *rim2Δ* Zellen mit den isogenen *rho*<sup>0</sup> und *mrs3/4Δ rho*<sup>0</sup> Zellen. Die Deletion von *RIM2* zeigte ein *rho*<sup>0</sup>-ähnliches Wachstumsverhalten. Bei der Dreifachdeletionszelle *mrs3/4Δ rim2Δ* hingegen ließ sich, im Vergleich zu *mrs3/4Δ rho*<sup>0</sup> eine leichte Verschlechterung des Wachstums auf Eisenmangelmedium beobachten (Abb. 2-3 A).

Ausgeprägter war der Effekt der Dreifachdeletion bei der Aktivierung des Eisenregulons. In *mrs3/4Δ rim2Δ* Zellen kam es, verglichen zu *rho*<sup>0</sup> Zellen zu einer achtfachen Erhöhung der *FET3* Expression. Indes wurde in *mrs3/4Δ rho*<sup>0</sup> Zellen nur eine vierfache Erhöhung festgestellt. Die parallele Zugabe des Eisenchelators BPS diente der Festsetzung einer maximalen Aktivierung von *FET3* in dieser Versuchsreihe (Abb. 2-3 B). Eine weitere Verifizierung dieser Ergebnisse erlaubte die Verwendung eines *pFIT3-GFP* Plasmids. Fit3 ist ein für die Fe<sup>3+</sup>-Siderophor-Aufnahme wichtiges Membran-verankertes Protein, dessen Promotor ebenfalls Aft1/2-abhängig induziert wird. Der *FIT3*-Promotor zeigte ähnlich wie bei *FET3* eine starke Aktivierung in *mrs3/4Δ rim2Δ* Zellen (15,5-fach), die höher ausfiel als in *mrs3/4Δ rho*<sup>0</sup> Zellen (vier-

fach). Hingegen hatte die *RIM2* Deletion keinerlei Effekte auf die Promotoraktivität von *FET3* und *FIT3* (Abb. 2-3 B und C).

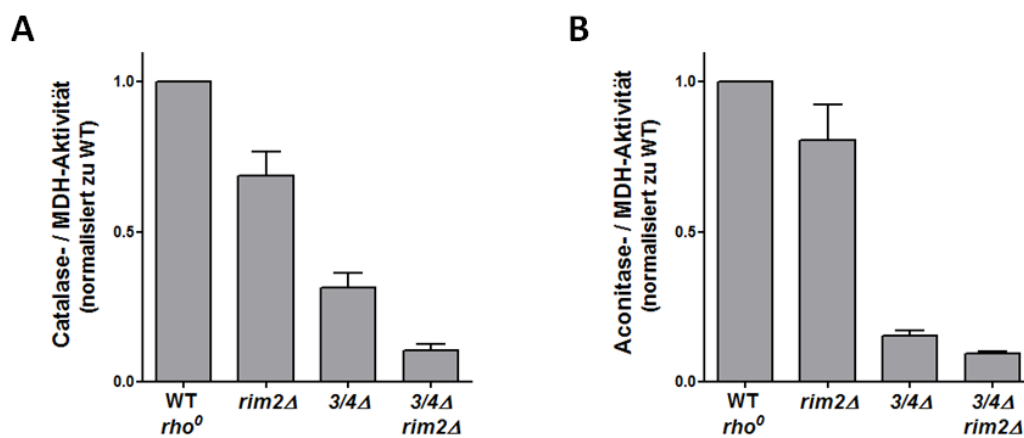


**Abb. 2-3 Die Deletion von *RIM2* hat einen negativen Effekt auf den Eisenmetabolismus von *mrs3/4* $\Delta$  Zellen. (A)** WT  $\rho^+$  als auch  $\rho^0$  Zellen und die gezeigten isogenen Deletionsstämme wurden in einer seriellen Verdünnungsreihe auf SD Medium mit und ohne BPS Supplementation aufgetragen und für 3 Tage bei 30 °C inkubiert. **(B, C)** *rim2* $\Delta$ , *mrs3/4* $\Delta$  (*3/4* $\Delta$ ) *rim2* $\Delta$  und  $\rho^0$  Zellen von WT und *mrs3/4* $\Delta$  wurden mit einem *pFET3-GFP* **(B)** oder einem *pFIT3-GFP* **(C)** Plasmid transformiert. Die Promoter Aktivität wurde über die GFP-spezifische Fluoreszenzemission exponentiell wachsender Zellen bestimmt. Fehlerbalken zeigen den SEM an (n>4).

Ein ähnliches Bild wurde in den Enzymmessungen ersichtlich. Die alleinige Deletion von *RIM2* hatte nur einen leicht negativen Effekt auf die Aktivität der Catalase und der Aconitase. Dagegen war in *mrs3/4* $\Delta$   $\rho^0$  Zellen die Catalase- bzw. Aconitase-Aktivität auf 30 % bzw. 15 % und in *mrs3/4* $\Delta$  *rim2* $\Delta$  Zellen auf 10 % im Vergleich zum  $\rho^0$  Wildtyp gesunken (Abb. 2-4).

Im Gegensatz zur Enzymmessung zeigten *rim2* $\Delta$  Zellen keinen Defekt in der *de novo* Fe/S-Cluster Synthese (Abb. 2-5). Die  $^{55}\text{Fe}$ -Insertion in Aconitase war in *mrs3/4* $\Delta$  *rim2* $\Delta$  und *mrs3/4* $\Delta$   $\rho^0$  Zellen unverändert. Im Gegensatz hierzu waren die  $^{55}\text{Fe}$ -Insertion in Isopropylmalat Isomerase (Leu1) und Biotin Synthase (Bio2) in *mrs3/4* $\Delta$

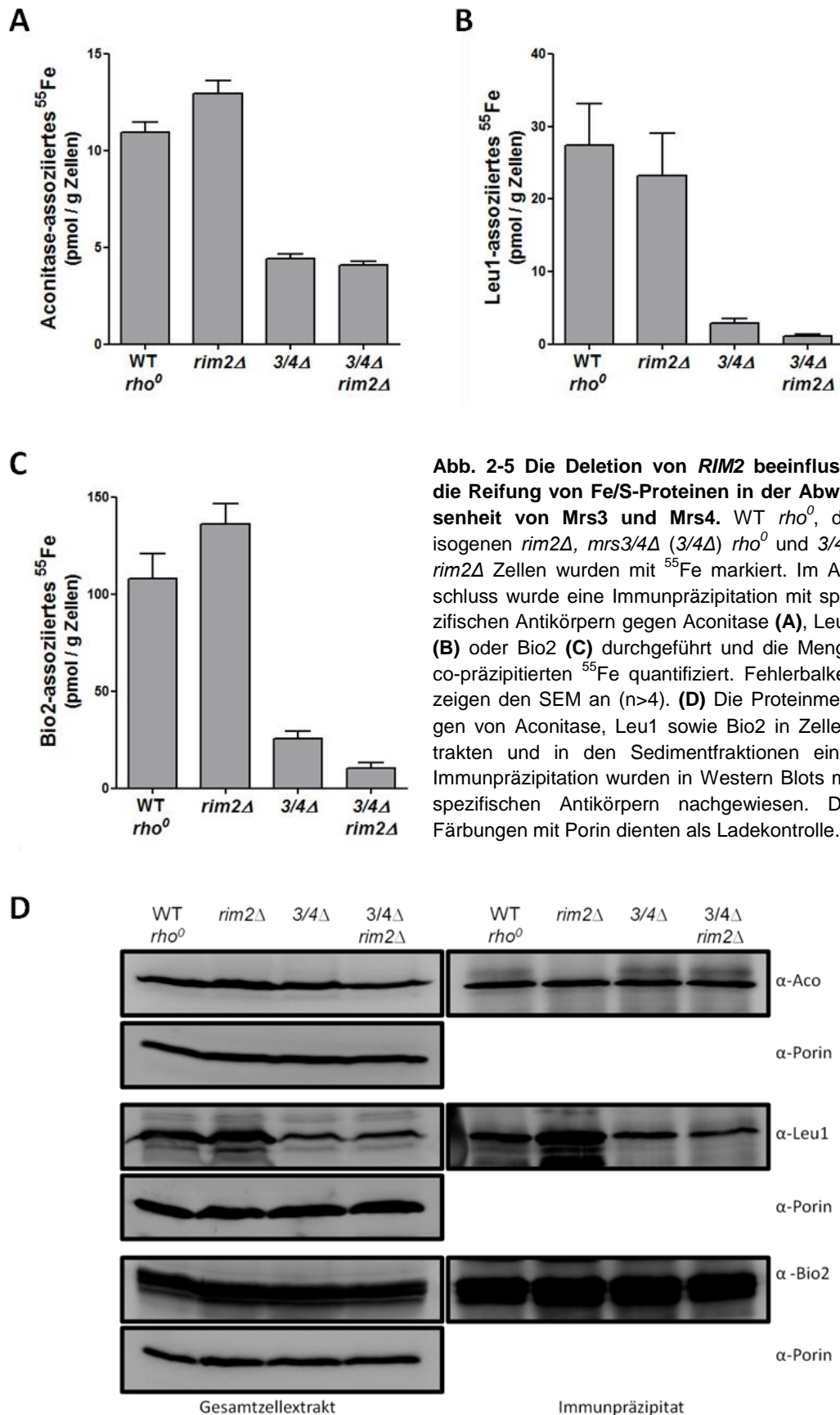
*rim2Δ* Zellen im Vergleich zu *mrs3/4Δ* Zellen um 2,5-fach verringert (Abb. 2-5 B und C). Da die Apo-Proteinmengen in allen Zellen ähnlich waren, ist der weitere Verlust der  $^{55}\text{Fe}$ -Insertion in diese Fe/S-Proteine wahrscheinlich auf einer weiteren Verringerung der Eisenaufnahme in die Mitochondrien von *mrs3/4Δ rim2Δ* Zellen zurückzuführen (Abb. 2-5 D). Die geringeren Leu1-Proteinlevels in *mrs3/4Δ* und in *mrs3/4Δ rim2Δ* Zellen beruhen auf der Wiedereinbringung des *LEU2* Gens, welches für die Deletion von *MRS4* als Marker verwendet wurde. Die Expression von Leu2 führt zur Erniedrigung der Leu1-Menge (Ihrig *et al.* 2010).



**Abb. 2-4 Die Deletion von *RIM2* in Kombination mit *mrs3/4Δ* Zellen beeinträchtigt die Aktivitäten Eisen-abhängiger Enzyme. (A, B)** WT *rho*<sup>0</sup> und die isogenen *rim2Δ*, *mrs3/4Δ* (*3/4Δ*) *rho*<sup>0</sup> und *3/4Δ rim2Δ* Zellen wurden in eisenhaltigem Medium kultiviert, und die Aktivitäten der Catalase und der Aconitase bestimmt. Enzymaktivitäten wurden auf die MDH-Aktivität normalisiert. Fehlerbalken zeigen den SEM an (n>4).

Zusammengefasst konnten keine signifikanten Fe/S-Cluster Synthesedefekte in *rim2Δ* Zellen festgestellt werden. Allerdings verstärkt die zusätzliche Deletion von *RIM2*, die in *mrs3/4Δ* Zellen vorhandenen Defekte von Eisen-abhängigen Proteinen. Dies stimmt mit dem Rim2-vermittelten Eisen/Pyrimidin Co-Import *in vitro* überein. Unter physiologischen Bedingungen, d.h. in Anwesenheit von Mrs3 und Mrs4, ist der mitochondriale Eisentransport über Rim2 minimal.



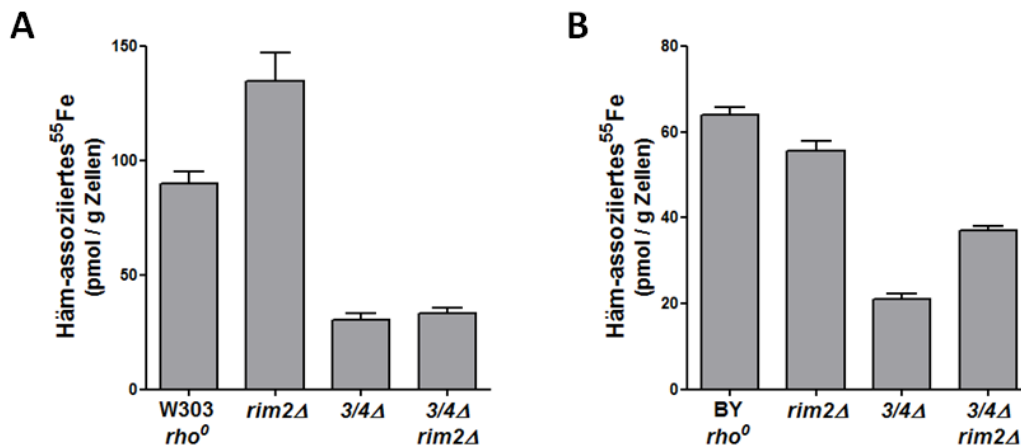


**Abb. 2-5 Die Deletion von *RIM2* beeinflusst die Reifung von Fe/S-Proteinen in der Abwesenheit von *Mrs3* und *Mrs4*.** WT  $\rho^0$ , die isogenen *rim2* $\Delta$ , *mrs3/4* $\Delta$  (*3/4* $\Delta$ )  $\rho^0$  und *3/4* $\Delta$  *rim2* $\Delta$  Zellen wurden mit  $^{55}\text{Fe}$  markiert. Im Anschluss wurde eine Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern gegen Aconitase (**A**), Leu1 (**B**) oder Bio2 (**C**) durchgeführt und die Menge co-präzipitierten  $^{55}\text{Fe}$  quantifiziert. Fehlerbalken zeigen den SEM an ( $n > 4$ ). (**D**) Die Proteinmengen von Aconitase, Leu1 sowie Bio2 in Zell-extrakten und in den Sedimentfraktionen einer Immunpräzipitation wurden in Western Blots mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die Färbungen mit Porin dienen als Ladekontrolle.

### 2.1.3 Die *RIM2* Deletion hat keinen Einfluss auf die Häm-Synthese

Unsere Resultate stehen im direkten Konflikt mit einer zeitlich parallel veröffentlichten Arbeit von Yoon *et al.* (Yoon *et al.* 2011). Die Daten in dieser Arbeit legen nahe, dass Rim2 eine zentrale Rolle bei der Eisenversorgung für die mitochondriale Häm-Synthese ausübt, die von der Rolle von Rim2 als Pyrimidin-Transporter unabhängig sein soll. Diese zentrale Aussage basierte auf den Beobachtungen, dass Mitochondrien aus *RIM2*-depletierten Zellen einen Häm-Synthesedefekt *in vitro* aufzeigten, der nicht auf einen defekten Pyrimidintransport zurückgeführt werden konnte (Yoon *et al.* 2011).

Im Hinblick auf diese Studie wurde die Häm-Synthese *in vivo* mit radioaktiver  $^{55}\text{Fe}$ -Markierung analysiert. Wie bereits bei Untersuchungen der Fe/S-Cluster Synthese wurden die *RIM2* Deletionen mit dem isogenen *rho*<sup>0</sup> Wildtyp sowie *mrs3/4Δ rho*<sup>0</sup> Zellen verglichen. Die  $^{55}\text{Fe}$ -Assoziation an Häm war um 1,5-fach höher in *rim2Δ* als im Wildtyp, und zwischen *mrs3/4Δ rho*<sup>0</sup> und *mrs3/4Δ rim2Δ* Zellen war kein wesentlicher Unterschied zu erkennen (Abb. 2-6 A). Diese Daten sprechen eindeutig gegen eine zentrale Rolle von Rim2 für die Häm-Bildung.

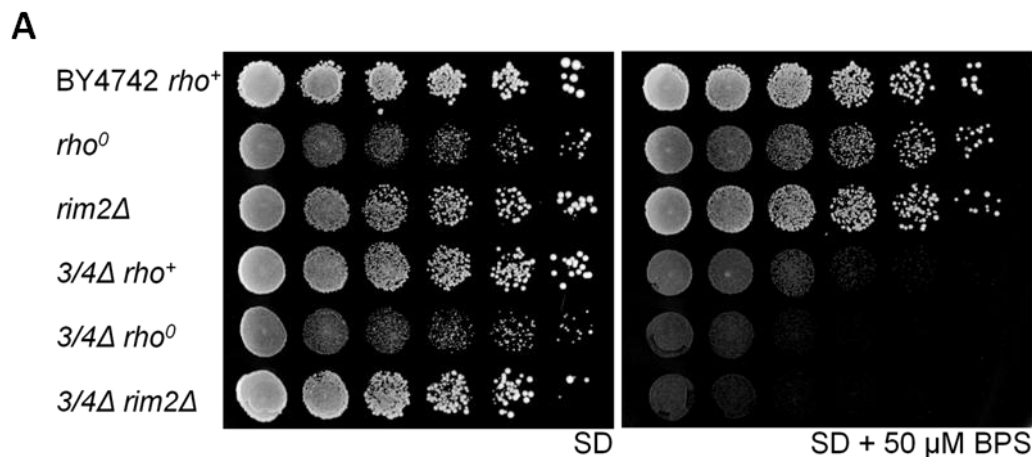


**Abb. 2-6 Die Deletion von *RIM2* verursacht keine Häm-Synthesedefekte *in vivo*.** *rim2Δ* Zellen, *rho*<sup>0</sup> Derivate von WT und *mrs3/4Δ* (*3/4Δ*) in W303-1A (**A**) und BY4742 (**B**) wurden radioaktiv mit  $^{55}\text{Fe}$  markiert. Radioaktives Häm wurde mit Butylacetat extrahiert und im Szintillationszähler quantifiziert. Fehlerbalken geben den SEM an ( $n > 4$ ).

Um auszuschließen, dass diese Diskrepanzen auf verschiedenen Stammhintergründen beruhten, wurden die Experimente im Stammhintergrund BY4742 wiederholt. Hierbei

ließ sich ebenfalls kein signifikanter Häm-Synthesedefekt in *rim2Δ* Zellen, im Vergleich zum BY4742 *rho*<sup>0</sup>, erkennen. Wie im W303 Stammhintergrund zeigten auch *mrs3/4Δ rim2Δ* Zellen im BY4742 Stamm eine 1,8-fache höhere Häm-Syntheserate als *mrs3/4Δ* Zellen (Abb. 2-6 B). Letztlich konnte keine entscheidende Funktion von Rim2 im mitochondrialen Eisentransport für die Häm-Synthese festgestellt werden.

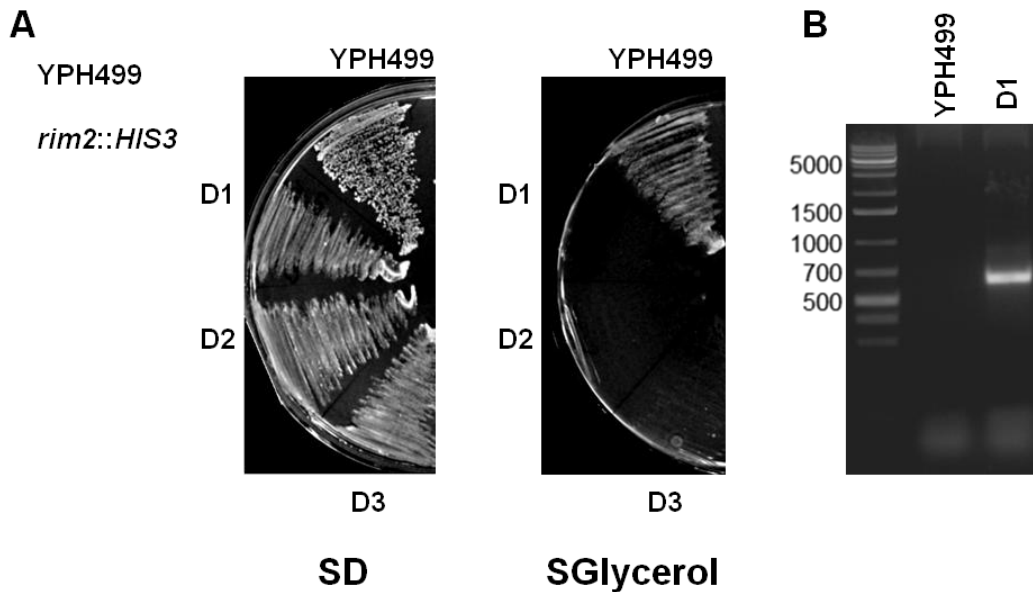
Im Wachstumstest zeigten die BY4742 Stämme ebenfalls einen ähnlichen Phänotyp wie W303. Erst die Kombination der Deletion von *RIM2* mit *mrs3/4Δ* Zellen verursachte einen Wachstumsdefekt auf Eisenmangelmedium. Dagegen war kein verringertes Wachstum von *rim2Δ* Zellen ersichtlich (Abb. 2-7 A).



**Abb. 2-7 Die *rim2Δ* Zelle verhält sich im BY4742 ähnlich wie im W303 Hefestamm. (A)** Übernachtskulturen vom Wildtypstamm BY4742 *rho*<sup>+</sup> als auch *rho*<sup>0</sup>, dessen isogenen *rim2Δ*, *mrs3/4Δ* (*3/4Δ*) und *3/4Δ rim2Δ* Zellen wurden in einer seriellen Verdünnung auf SD Medium mit und ohne BPS aufgetragen und für 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

Trotz geringfügiger Unterschiede zwischen dem BY4742 und dem W303 Stamm hat somit die allgemeine Aussage, dass Rim2 den Eisenmetabolismus in Anwesenheit von Mrs3 und Mrs4 nur gering beeinflusst, weiterhin Bestand. Bezeichnenderweise ist in beiden Wildtypstämmen kein signifikanter Häm-Synthesedefekt in *rim2Δ* Zellen ersichtlich. Dancis und Mitarbeiter (2011) begründen die Verwendung eines Galactose-regulierten *RIM2* Stamms im Stammhintergrund YPH499 (*rho*<sup>+</sup>) mit der Aussage, dass die Deletion in diesem Hefestamm letal sei (Yoon *et al.* 2011). Die Deletion von *RIM2* war jedoch, wie im W303 und BY4742 auch im YPH499 Hefestamm möglich. In allen Hefestämmen konnten respiratorisch-defiziente (kein Wachstum auf nicht-fermentativen Medium wie Glycerin), aber lebensfähige *rim2Δ* Zellen generiert werden

(Abb. 2-8). Daher wäre die Verwendung von *rim2Δ* oder *RIM2* depletierbaren Zellen in einem *rho<sup>0</sup>* Hintergrund möglich gewesen.

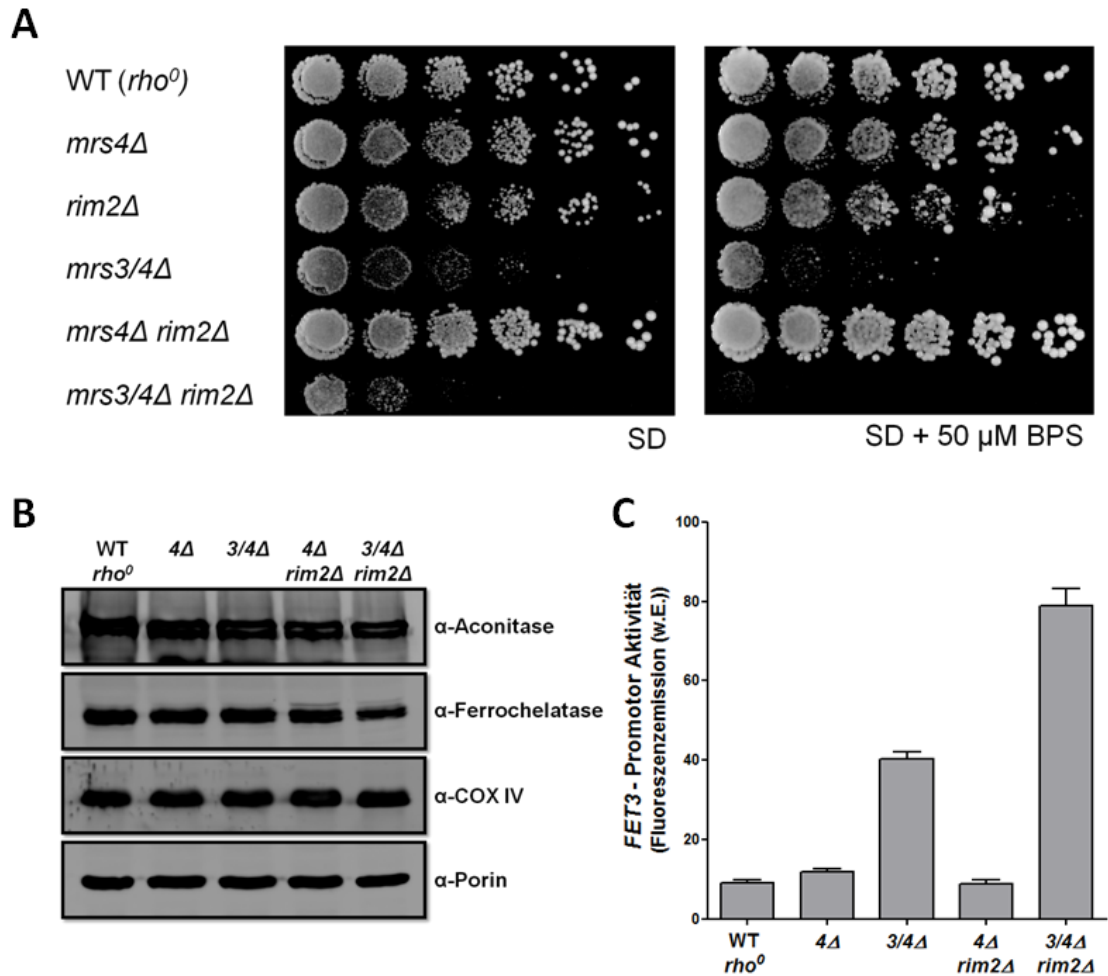


**Abb. 2-8 Rim2 ist nicht essentiell im YPH499 Hintergrund.** (A) PCR-vermittelte homologe Rekombination von *RIM2* mit einer *HIS3*-Markerkassette wurde im YPH499-Hefestamm durchgeführt. Histidin-prototrophe Transformanten wurden zusammen mit dem isogenen Wildtyp YPH499 auf SC-Platten (ohne Histidin) mit Glucose oder Glycerin ausgestrichen. Die Deletion von *RIM2* (D1-3) verursachte respiratorisch-defiziente Zellen, die auf nicht-fermentativem Medium (SGlycerin) nicht wachsen können. (B) Die korrekte Integration der *HIS3*-Kassette in den *RIM2*-Genlocus wurde über PCR verifiziert.

#### 2.1.4 Die *RIM2* Deletion verursachte keine Defekte im Eisenmetabolismus von *mrs4Δ* Zellen

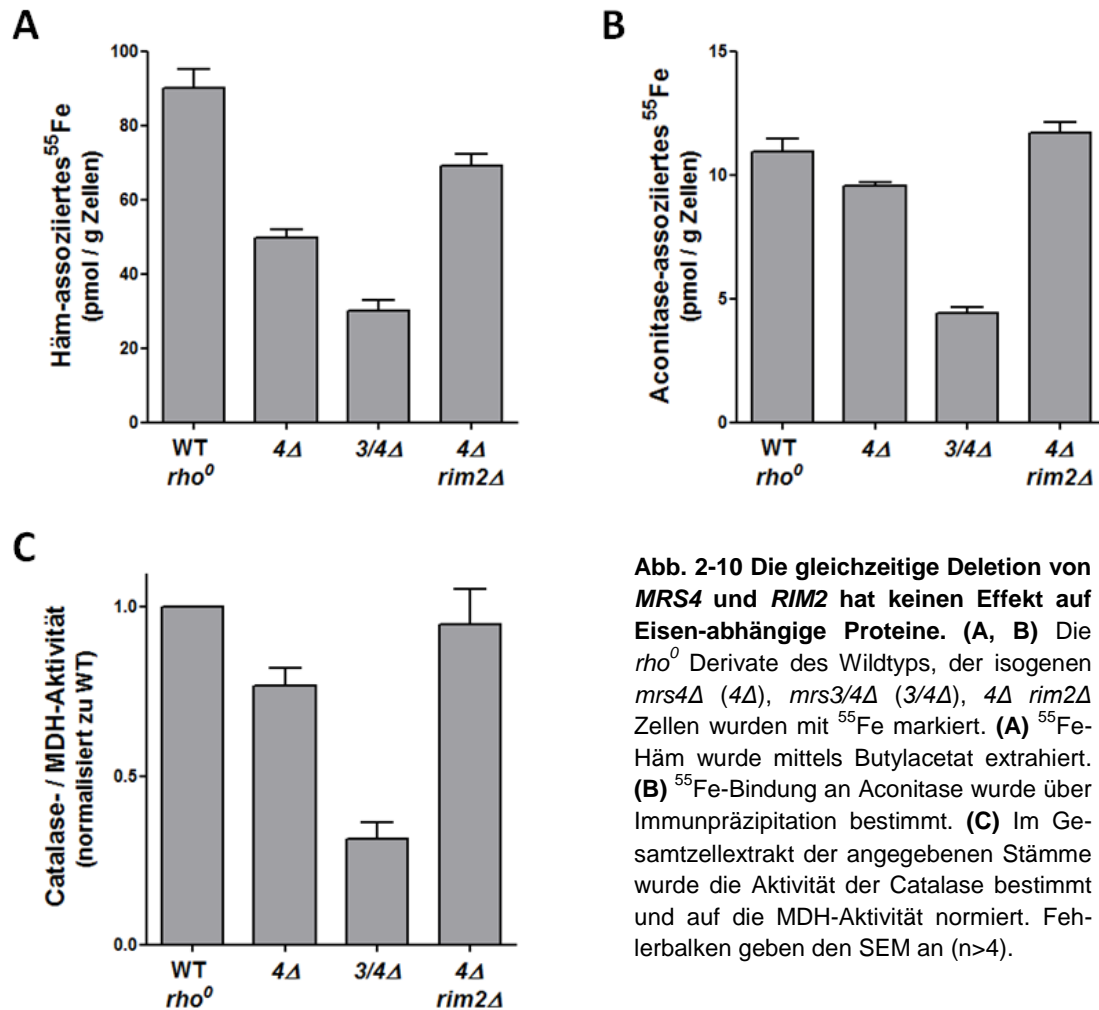
Die alleinige Deletion von *RIM2* hatte keine deutlichen Fe/S-Cluster Assemblierungs- oder Häm-Synthesedefekt, in den verwendeten Hefestämmen, zur Folge. Daher spielt Rim2 keine entscheidende Rolle im mitochondrialen Eisentransport, solange Mrs3 und Mrs4 anwesend sind. Zur weiteren Untermauerung dieser Schlussfolgerung wurden die relativen Effekte der Deletion von *RIM2* mit der von *MRS3* in einem *mrs4Δ rho<sup>0</sup>* Stamm verglichen, in welchem bereits *MRS4* fehlte.

Auf Eisenmangelmedium zeigte sich in *mrs4Δ/rim2Δ* Zellen im Gegensatz zu *mrs3/4Δ rho<sup>0</sup>* Zellen kein eingeschränktes Wachstum. Ebenfalls erfolgte keine Aktivierung des Eisenregulons (Abb. 2-9).



**Abb. 2-9 Die Deletion von *RIM2* in Zellen ohne *Mrs4* hat keinen Effekt auf das Wachstum und verursacht keine Aktivierung des Eisenregulons. (A)** Wachstumstest der *rho*<sup>0</sup> Derivate des Wildtyps, der isogenen *rim2*Δ, *mrs4*Δ (4Δ), *mrs3/4*Δ (3/4Δ), 4Δ *rim2*Δ und 3/4Δ *rim2*Δ Zellen im SD Kontrollmedium und Eisenmangelmedium. **(B)** Gesamtzellextrakte der in (A) verwendeten Stämme wurden mit spezifischen Antikörpern für Fe/S-Proteine gefärbt. Porin diente als Ladekontrolle. **(C)** Die *FET3*-Promotoraktivität wurde durch die Fluoreszenz-Emission der mit *pFET3-GFP* transformierten Zellen gemessen. Fehlerbalken zeigen den SEM an (n>4).

Darüber hinaus zeigten *mrs4*Δ/*rim2*Δ Zellen in der *de novo* Synthese von Häm und der Assemblierung der mitochondrialen Aconitase nur geringe Defekte, die viel geringer ausfielen als in *mrs3/4*Δ *rho*<sup>0</sup> Zellen. Obwohl die Häm-Synthese bereits in *mrs4*Δ Zellen auf ca. die Hälfte sank, ergab sich in *mrs4*Δ/*rim2*Δ Zellen lediglich eine Reduktion von einem Viertel im Vergleich zum Wildtyp. Die geringste <sup>55</sup>Fe-Einbaurrate zeigte sich, wie erwartet bei der Deletion beider, als Eisentransporter charakterisierten Carrier *Mrs3* und *Mrs4* (Abb. 2-10 A).



**Abb. 2-10 Die gleichzeitige Deletion von *MRS4* und *RIM2* hat keinen Effekt auf Eisen-abhängige Proteine. (A, B)** Die *rho*<sup>0</sup> Derivate des Wildtyps, der isogenen *mrs4Δ* (*4Δ*), *mrs3/4Δ* (*3/4Δ*), *4Δ rim2Δ* Zellen wurden mit  $^{55}\text{Fe}$  markiert. **(A)**  $^{55}\text{Fe}$ -Häm wurde mittels Butylacetat extrahiert. **(B)**  $^{55}\text{Fe}$ -Bindung an Aconitase wurde über Immunpräzipitation bestimmt. **(C)** Im Gesamtzellextrakt der angegebenen Stämme wurde die Aktivität der Catalase bestimmt und auf die MDH-Aktivität normiert. Fehlerbalken geben den SEM an ( $n > 4$ ).

Konsistent hierzu waren die Werte für die  $^{55}\text{Fe}$ -Insertion in die Fe/S-Cluster-haltige Aconitase in *mrs4Δ* lediglich um 12 %, in *mrs3/4Δ* Zellen jedoch um 60 % im Vergleich zum Wildtyp gesunken (Abb. 2-10 B). Die *mrs4Δ/rim2Δ* Zellen zeigten einen leichten Anstieg. Die Catalase Aktivität in den *mrs4Δ* Zellen war in Kombination mit der Deletion von *MRS3* um 70 % geringer, in Kombination mit der Deletion von *RIM2* jedoch lediglich um 5 % reduziert (Abb. 2-10 C). Obwohl einzelne Effekte unterschiedlich stark ausfielen, war der Phänotyp in *mrs3/4Δ* stets wesentlich ausgeprägter als in *mrs4Δ/rim2Δ* Zellen.

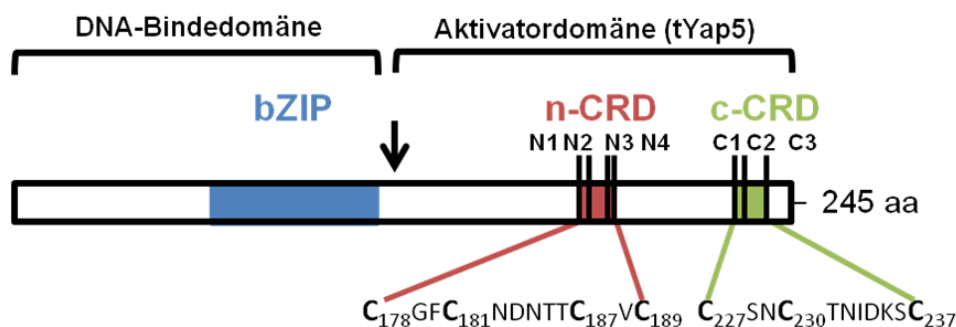
Zusammengefasst war die *mrs4Δ/rim2Δ* Zelle weniger von der Deletion des mitochondrialen Eisentransporters Mrs4 betroffen, als die *mrs4Δ* Zelle *per se*. Die Doppeldeletion von *MRS3* und *MRS4* hingegen zeigte eine starke Beeinträchtigung in der Biosynthese Eisen-abhängiger Proteine. Dies bestätigt die Funktion von Mrs3 und Mrs4 als entscheidende mitochondriale Eisentransporter. Rim2 hingegen wird in der

Hefezelle nicht spezifisch für die Eisenhomöostase benötigt, solange Mrs3 oder Mrs4 anwesend ist. Allerdings induziert die Deletion von *RIM2* in *mrs3/4Δ* Zellen einen Defekt in der Fe/S-Cluster Biogenese. Dies wiederum impliziert eine Funktion von Rim2 im mitochondrialen Eisentransport, die allerdings physiologisch nur auffällig wird, wenn die eigentlichen Eisentransporter Mrs3 und Mrs4 fehlen. Die hier beschriebenen Ergebnisse der *in vivo* Untersuchungen zu Rim2 können zwanglos mit dem Rim2-vermittelten Co-Import von Eisen oder anderen divalenten Metallionen mit Pyrimidinnukleotiden erklärt werden.

## 2.2 Charakterisierung des Eisen-Sensors Yap5

Genetische Studien haben gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor Yap5 in Gegenwart von hohen Eisenmengen die Expression des vakuolären Eisen-Importers Ccc1 aktiviert und somit eine entscheidende Rolle bei der Detoxifizierung von Fe übernimmt (Li *et al.* 2008, Li *et al.* 2011, Pimentel *et al.* 2012). Wie Yap5 den Eisenstatus in der Zelle erfasst, ist allerdings unklar.

Yap5 gehört zur Yap-Familie der AP-1-ähnlichen bZIP-Transkriptionsregulatoren, die in Stress-induzierten Zellantworten involviert sind (Rodrigues-Pousada *et al.* 2010). Yap5 ist modular aufgebaut und besteht aus einer N-terminalen DNA-Bindedomäne mit einem basischen Leucin-Zipper (bZIP)-Motiv zur DNA-Bindung an die sog. *Yap-consensus Sequence* und einer C-terminalen Aktivator-domäne (tYap5), die zwei Cystein-reiche Domänen (CRD) aufweist. Diese CRDs bestehen aus vier konservierten Cysteinen in der N-terminalen, (N1, N2, N3 und N4) und drei weiteren konservierten Cysteinen in der C-terminalen Region (C1, C2 und C3) (Abb. 2-11). Das Vorhandensein dieser typischen Fe/S-Cluster-koordinierenden Aminosäure könnte ein Hinweis auf die Bindung von Fe/S-Clustern und / oder Fe-Ionen darstellen.



**Abb. 2-11 Eine schematische Darstellung des Transkriptionsfaktors Yap5.** Die Proteinsequenz von Yap5 weist das typische bZIP-Motiv der AP-1 Familie für die DNA-Bindung auf, sowie zwei Cystein-reiche Domänen (CRD). Die N-terminale Domäne besteht aus vier (N1-4) und die C-terminale CRD aus drei (C1-3) konservierten Cysteinen. Der Pfeil zeigt den in dieser Studie verwendeten Start der verkürzten Yap5 Version (tYap5) an. Die Darstellung ist angelegt an eine Veröffentlichung von Li *et al.* 2008.

Des Weiteren legt eine genetische Studie die Beteiligung eines Fe/S-Cofaktors für die transkriptionelle Aktivität von Yap5 nahe (Li *et al.* 2012). Biochemisch wurde dieser Befund bisher jedoch noch nicht belegt. Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche Eisen-



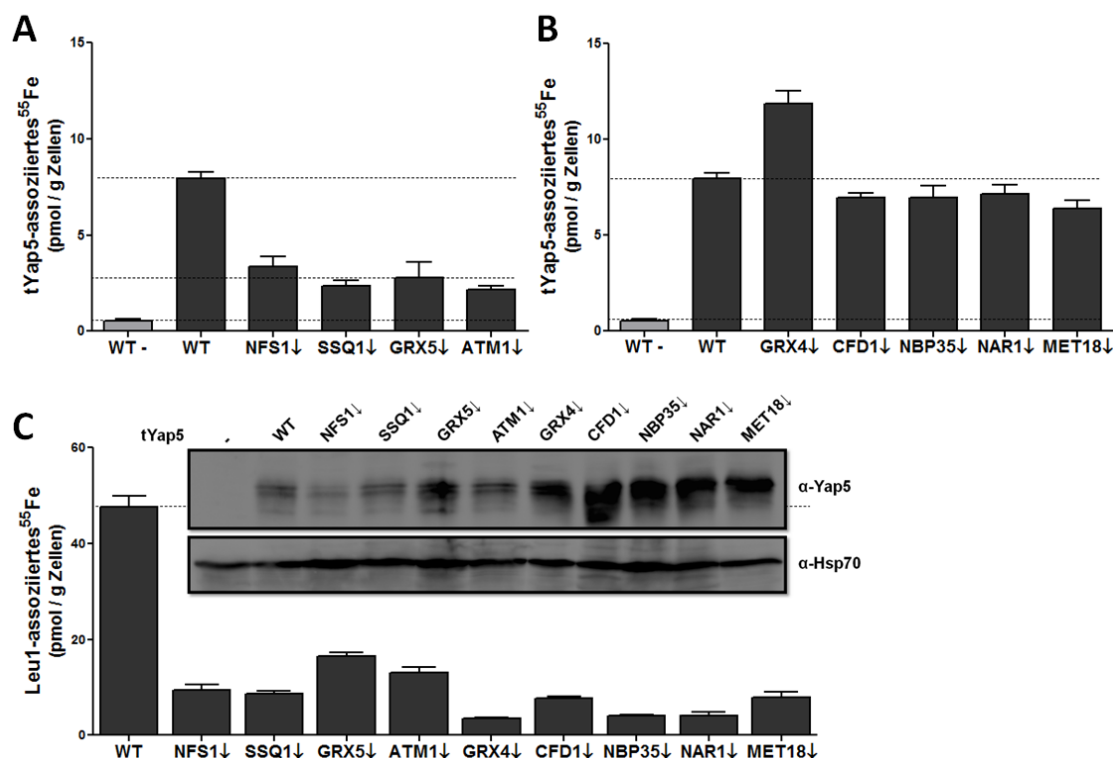
bzw. Fe/S-Cluster Bindung an Yap5 nachzuweisen sowie diese genauer zu charakterisieren. Hierzu wurden Untersuchungen an *S. cerevisiae in vivo* und am rekombinanten Protein *in vitro* durchgeführt.

### 2.2.1 Der Transkriptionsfaktor Yap5 bindet einen Fe/S-Cluster zur Aktivierung der Expression von CCC1 bei Eisenüberschuss

Zur Überprüfung einer Eisenbindung wurde Yap5 auf die Aktivatordomäne (tYap5) gekürzt (Abb. 2-11) und C-terminal an einen Myc-tag fusioniert. Dieses Konstrukt (tYap5) wurde zunächst in W303-1A Wildtyp transformiert und mit radioaktivem Eisen markiert. Yap5 wurde mit Antikörpern gegen Myc immunpräzipitiert und die Co-Immunpräzipitierte Menge an  $^{55}\text{Fe}$  quantifiziert. Signifikante  $^{55}\text{Fe}$ -Mengen konnten mit Myc Antikörpern aus Zellen, die tYap5 exprimierten, immunpräzipitiert werden. Die Menge an Radioaktivität war 15-fach höher als aus Zellen, die mit einem Leervektor transformiert waren (Abb. 2-12). Diese Daten zeigten, dass Yap5 Eisen bindet. Zur Differenzierung zwischen der Bindung von Eisen in Form eines Eisenions oder eines Fe/S-Cofaktors wurde die *de novo*  $^{55}\text{Fe}$ -Assoziation an tYap5 in Stämmen bestimmt, in denen eine einzelne Komponente der mitochondrialen Fe/S-Assemblierung- und Export-Maschinerie (ISC) sowie der cytosolischen Fe/S-Assemblierung-Maschinerie (CIA) depletiert werden konnte. In diesen sog. „Gal“ Stämmen wird die Expression der zu depletierenden Gene über einen chromosomal integrierten *GAL1-10* Promotor getrieben, der in Gegenwart von Galactose aktiv ist, aber bei Glucose Zugabe reprimiert wird. Mit Hilfe dieser *GAL*-Promotor Konstrukte konnte gezeigt werden, dass in depletierten Gal-NFS1, Gal-SSQ1, Gal-GRX5 und Gal-ATM1 Zellen die  $^{55}\text{Fe}$ -Bindung auf tYap5 auf 28 – 43 % des Wertes im Wildtyp sank (Abb. 2-12 A). Da die Proteinlevels, mit Ausnahme von Gal-NFS1, dem des Wildtyps gleichen (Einschub in Abb. 2-12 C), lässt die Abhängigkeit von der ISC-Assemblierung- (Nfs1, Ssq1 und Grx5) und Export-Maschinerie (Atm1) auf die Bindung eines Fe/S-Clusters schließen.

Interessanterweise war dieser Rückgang der *in vivo* Eisenbindung auf tYap5 nicht zu sehen, wenn die Faktoren der cytosolischen CIA-Maschinerie Cfd1, Nbp35, Nar1, Met18 depletiert wurden (Abb. 2-12 B). Dies war überraschend, da es sich bei Yap5 um ein nukleäres bzw. aufgrund der Verkürzung wahrscheinlich um ein cytosolisches Protein handelt. Im Unterschied zu den CIA- und ISC-Stämmen (Abb. 2-12 A und B)

war die  $^{55}\text{Fe}$ -Bindung an tYap5 in Gal-GRX4 (*GAL-L GRX4 grx3Δ*) 1,5-fach erhöht. Die parallel durchgeführte Präzipitation des cytosolisch lokalisierten [4Fe-4S]-Proteins Leu1 diente der Kontrolle einer effizienten Depletion der einzelnen Proteine auf ein für die Fe/S-Cluster Biosynthese kritisches Niveau. In allen verwendeten Stämmen zeigte sich ein starker Abfall der  $^{55}\text{Fe}$ -Assoziation an Leu1. Dagegen waren die Proteinlevels von Yap5 in den verwendeten ISC-Stämmen ähnlich der des Wildtyps. In den CIA-Stämmen waren diese im Vergleich zum WT sogar leicht erhöht (Abb. 2-12 C und Einschub). Der Grund für die unterschiedlichen Proteinlevels von tYap5 ist unbekannt.



**Abb. 2-12 Die  $^{55}\text{Fe}$ -Assoziation an tYap5 ist abhängig von der ISC-, aber nicht von der CIA-Maschinerie.** (A) W303 WT sowie die angegebenen reprimierten Gal-ISC Stämme wurden mit dem tYap5-myc Plasmid transformiert und nach 16 h in eisenarmen Medium für 2 h mit  $^{55}\text{Fe}$  markiert. tYap5 wurde aus dem Gesamtzellextrakt mit Myc Antikörpern immunpräzipitiert und das co-präzipitierte  $^{55}\text{Fe}$  mittels eines Scintillationszählers bestimmt. (B) Wie in (A) beschrieben wurde ebenfalls die  $^{55}\text{Fe}$ -Assoziation an tYap5 in Gal-Grx4 und den angeführten Gal-CIA Stämmen bestimmt. (C) Parallel zu Yap5 wurde die Eisenbindung an Leu1 bestimmt. Western Blots des Gesamtzellextrakts (Einschub in C) wurden mit einem spezifischen Yap5-Antikörper, sowie mit Hsp70 als Ladekontrolle gefärbt. Fehlerbalken geben den SEM an ( $n > 4$ ).

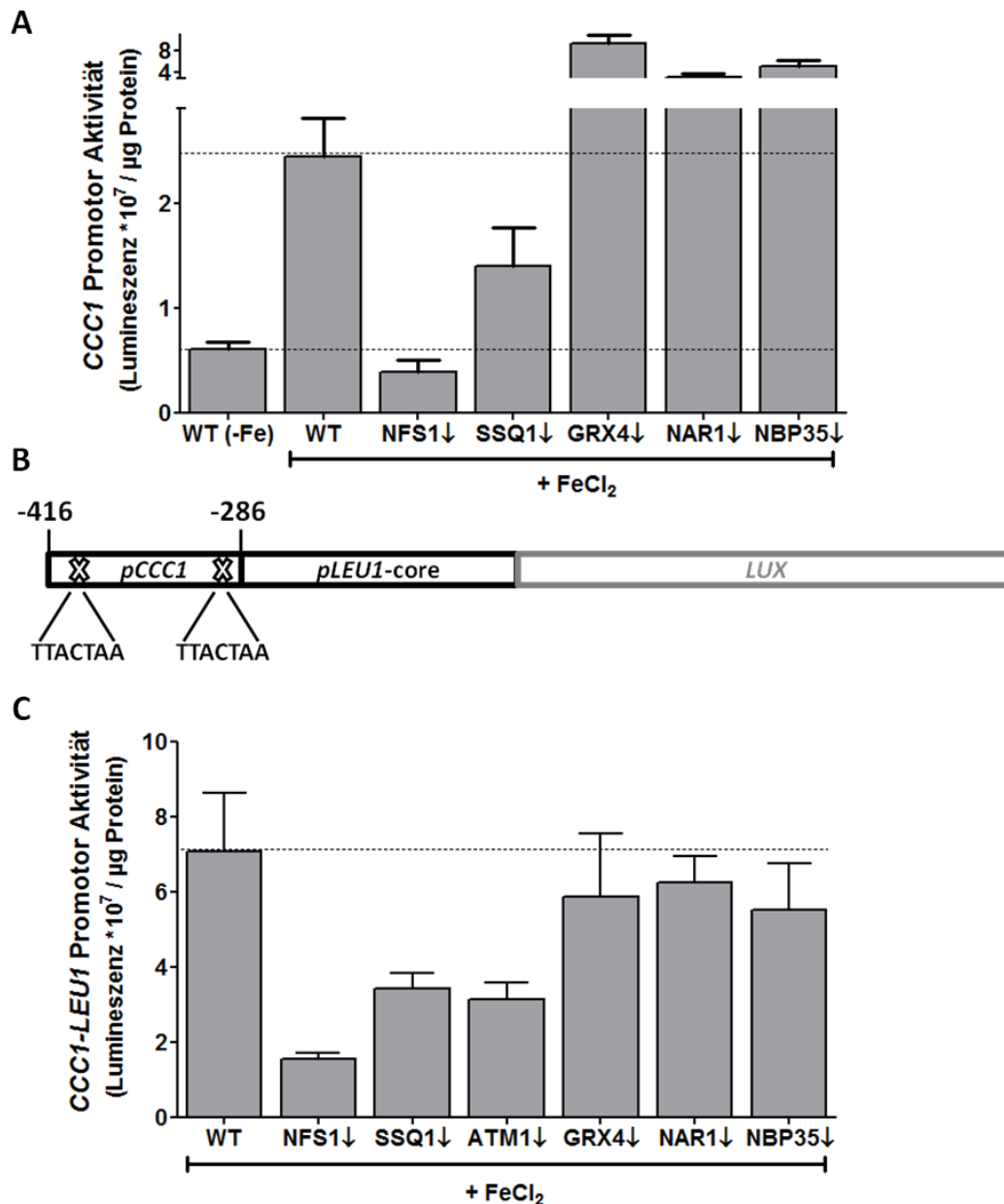
Zusammengefasst assembliert tYap5 einen ISC-abhängigen, aber CIA-unabhängigen Fe/S-Cluster. Eine ähnliche Abhängigkeit von der ISC- nicht aber der CIA-Maschinerie wurde beim cytosolischen Glutaredoxin Grx4 festgestellt, welches einen gebrückten

[2Fe-2S]-Cluster bindet. Aufgrund dessen lässt sich vermuten, dass tYap5 einen [2Fe-2S]-Cofaktor bindet.

Des Weiteren war es wichtig festzustellen, ob die Bindung des Fe/S-Clusters an tYap5 entscheidend für die Eisen-abhängige transkriptionelle Aktivität von Yap5 ist, oder lediglich eine strukturelle Funktion vermittelt. Yap5 ist als ein Sensor für hohe Eisenkonzentrationen beschrieben und aktiviert dabei den *CCC1*-Promotor (Li *et al.* 2008, Li *et al.* 2001b). Zur Messung der Yap5-vermittelten Transkriptionsaktivität wurde der *CCC1*-(-1 bis -600 bp) Promotor *upstream* des Reporterenzym Luciferas (LUX) von *Photinus pyralis* fusioniert. Dieses Konstrukt, *pCCC1-LUX* genannt, wurde in WT und den Gal-regulierten ISC- und CIA-Stämmen transformiert. Zur Einstellung von Hocheisenbedingungen wurden die transformierten Zellen in Medium mit 1 mM Eisen(II)-Chlorid angezogen. Parallel zum Verlust der  $^{55}\text{Fe}$ -Bindung in den ISC-Stämmen, Gal-NFS1 und Gal-SSQ1, zeigte sich ebenfalls ein Verlust der transkriptionellen Aktivierung von *CCC1*. Dagegen stieg die Aktivität in Gal-GRX4 sowie in den CIA-Stämmen, Gal-NAR1 und Gal-NBP35, an (Abb. 2-13 A).

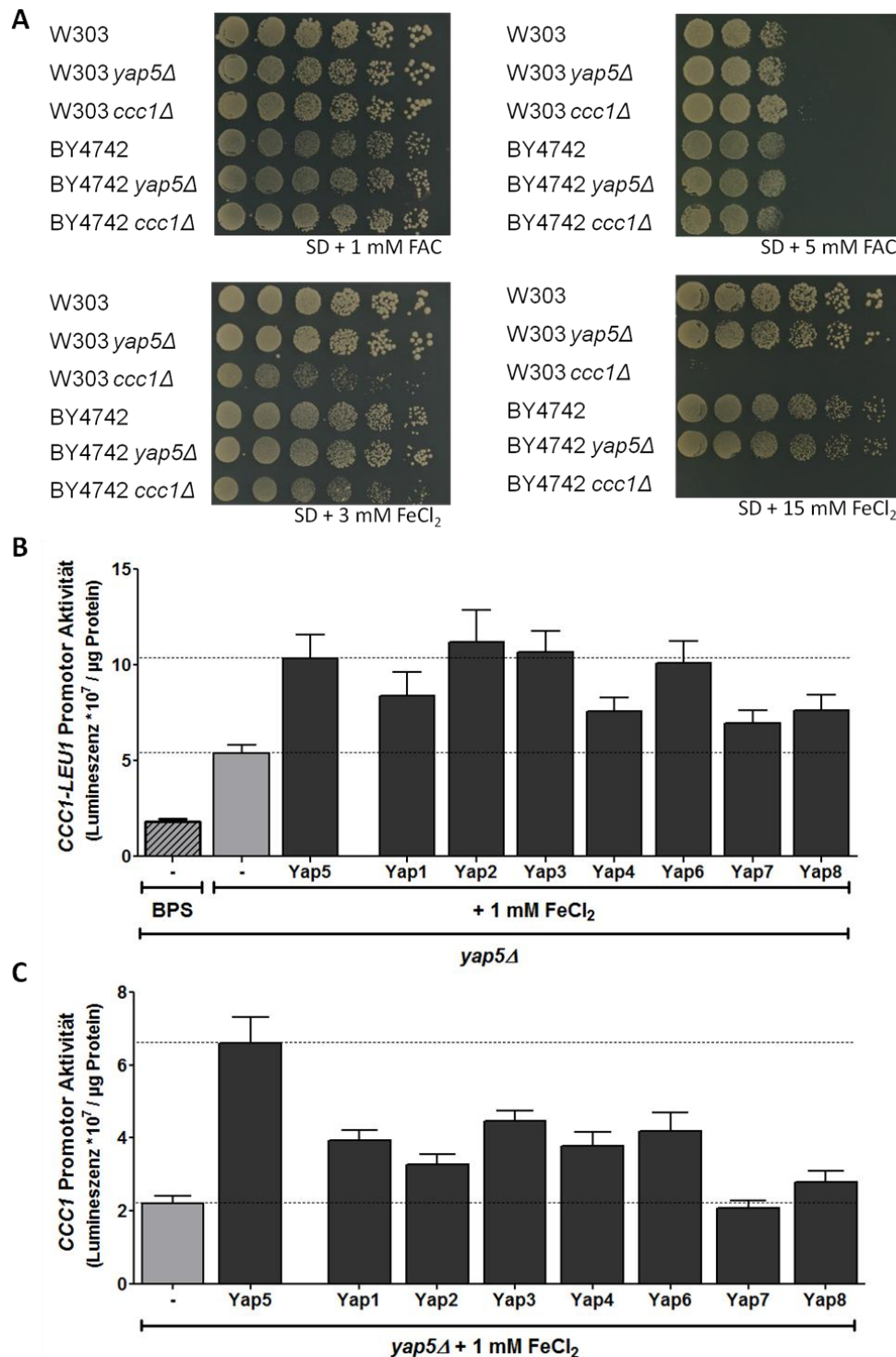
Um die Fragestellung nach der Funktion des Fe/S-Clusters an Yap5 so spezifisch wie möglich zu untersuchen und zusätzliche Effekte anderer Transkriptionsfaktoren zu minimieren, wurde ein Hybridpromotor hergestellt, in dem die *Yap-consensus Sequence* (TTACTAA) des *CCC1*-Promotors (-416 bis -286 bp) direkt vor der Yap5-unabhängigen Polymerase-Bindestelle des *core* Promotors des *LEU1* Gens kloniert wurde (Abb. 2-13 B) (Ihrig *et al.* 2010). Sollte der Fe/S-Cluster von Yap5 physiologisch relevant für seine regulierende Funktion als Transkriptionsfaktor sein, dann sollte es auch hier zur ISC- aber nicht CIA-abhängigen Aktivierung des *pCCC1-pLEU1* Hybridpromotors kommen.

Die mittels der Luciferase-spezifischen Biolumineszenz gemessene Stärke des *pCCC1-pLEU1* Hybridpromotors (*pCCC1-pLEU1-LUX*) war in Gal-NFS1 Zellen ca. 5-fach, in Gal-SSQ1 und Gal-ATM1 ca. 2-fach reduziert (ISC-Faktoren). Dagegen war die Luciferase-Aktivität in depletierten Gal-GRX4, Gal-NAR1 sowie Gal-NBP35 Zellen nicht wesentlich geringer als im Wildtyp (Abb. 2-13 C). Die ISC-Abhängigkeit der transkriptionellen Aktivität von Yap5 zeigte, dass die Bindung des Fe/S-Clusters entscheidend an der transkriptionellen Aktivität von Yap5 in *S. cerevisiae* beteiligt ist.



**Abb. 2-13 Die Yap5-regulierte CCC1 Expression ist von der mitochondrialen ISC-, aber nicht der cytosolischen CIA-Maschinerie abhängig. (A)** WT (W303-1A) sowie die angegebenen Gal-Stämme wurden mit dem *pCCC1-LUX* Plasmid transformiert und 12 h in Minimalmedium mit 1 mM FeCl<sub>2</sub> angezo-gen. Anschließend wurde die Biolumineszenz der exprimierten Luciferase im Zelllysate gemessen und zur Proteinmenge normalisiert. **(B)** Schematische Darstellung des verwendeten Hybridpromotors aus der Yap5-Bindestelle am CCC1-Promotor (-416 bis -286 bp) sowie dem *LEU1-core* Promotor *upstream* vom Luciferase Gen (*LUX*). **(C)** WT (W303-1A) und die angegebenen Gal-Stämme wurden mit dem *pCCC1-pLEU1-LUX* Plasmid transformiert. Die Biolumineszenz der exprimierten Luciferase wurde wie in (A) beschrieben, bestimmt. Fehlerbalken geben den SEM an (n>4).

In der Literatur bestehen allerdings widersprüchliche Angaben zur Rolle der Yap5-regulierten Expression von *CCC1* (Li *et al.* 2008, Pimentel *et al.* 2012). Während eine Studie Yap5 als essentiellen *CCC1* Aktivator beschreibt, wurde dem in einer anderen Studie widersprochen.



**Abb. 2-14 Yap5 ist nicht der einzige Transkriptionsfaktor, der die Expression von *CCC1* unter Hocheisenbedingungen aktivieren kann. (A)** Vergleichende Wachstumstests mit WT, *yap5*Δ sowie *ccc1*Δ Zellen im W303 und im BY4742 Hefestamm-Hintergrund. Übernachtskulturen der beschriebenen Stämme wurden auf SD-Platten mit FAC oder FeCl<sub>2</sub> Supplementation in einer seriellen Verdünnung aufgetragen. Die Platten wurden für 48 h bei 30 °C inkubiert. **(B)** *yap5*Δ Zellen wurden mit dem Reporterkonstrukt *pCCC1-pLEU1-LUX* sowie 2µ-Plasmiden, die Yap1 bis Yap8 kodieren, transformiert und in Medium mit Zugabe des Eisenchelators BPS oder unter Eisensupplementation von 1 mM FeCl<sub>2</sub> kultiviert. Die Biolumineszenz wurde im Gesamtzellextrakt gemessen und zur Proteinmenge normalisiert. **(C)** *yap5*Δ Zellen wurden mit 2µ-Plasmiden transformiert, die Yap1 bis Yap8 kodieren sowie *pCCC1-LUX*. Die Aktivität des *CCC1* Promotors wurde wie in (B) beschrieben bestimmt. Fehlerbalken geben den SEM an (n>4).

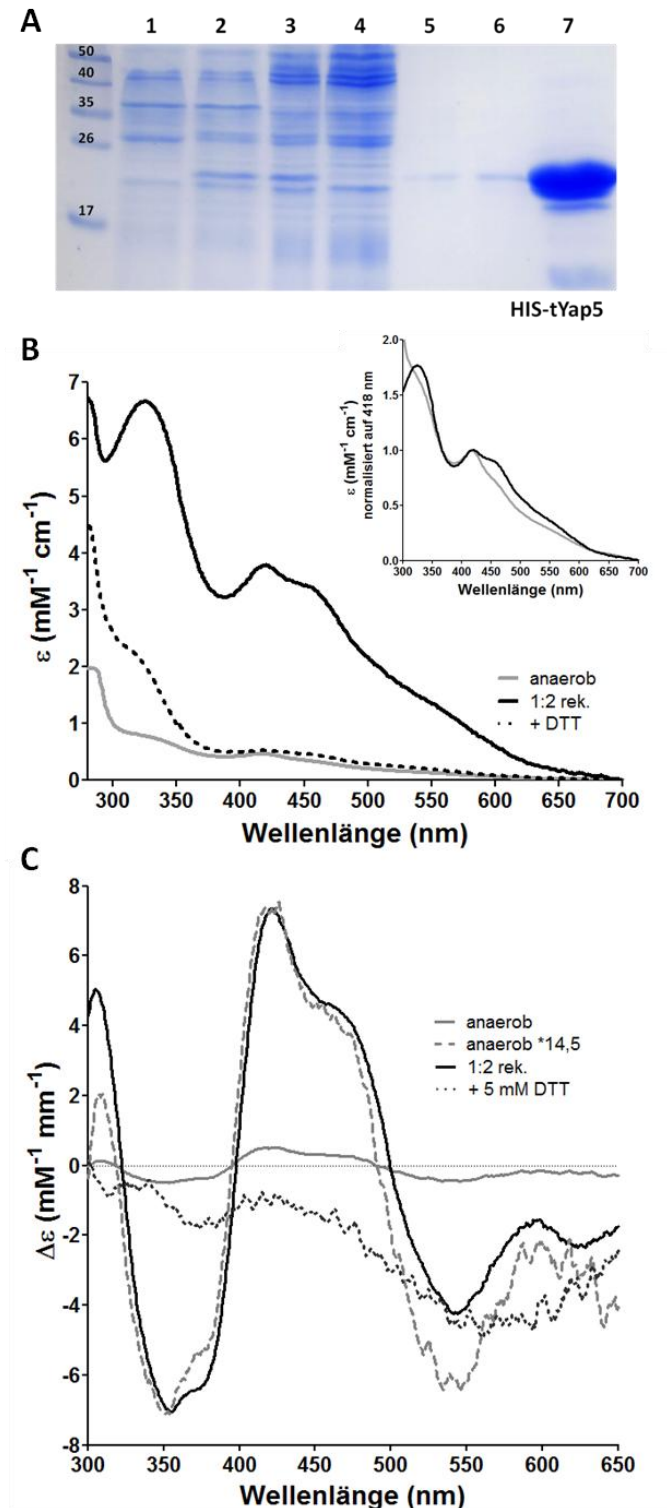
In der Tat konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *yap5Δ* Zellen sowohl im W303 als auch im BY4742 Stammhintergrund nicht den gleichen letalen Phänotyp in Gegenwart hoher Eisenmengen zeigte, wie *ccc1Δ* Zellen (Abb. 2-14 A). Dieser Wachstumsdefekt von *ccc1Δ* Zellen indes zeigte sich nur in Gegenwart von  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{FeCl}_2$ ) und nicht bei einer  $\text{Fe}^{3+}$  (FAC)-Quelle. Daher wurde für diese Studien stets reduziertes  $\text{FeCl}_2$  eingesetzt. Weiterhin zeigte sich, dass der *pCCC1-pLEU1*-Promotor in *YAP5*-deletierten Zellen bei Zugabe von Eisen induziert werden kann (Abb. 2-14 B). Dies steht im Widerspruch zur Annahme, dass Yap5 für die Regulation von *CCC1* essentiell ist (Li *et al.* 2008).

Da alle Transkriptionsfaktoren der Yap-Familie an sehr ähnliche Erkennungssequenzen (*Yap-consensus Sequence*) binden (Rodrigues-Pousada *et al.* 2010, Tan *et al.* 2008), besteht die Möglichkeit redundanter Funktionen. Infolgedessen wurden *YAP1* bis *YAP8* in *yap5Δ* Zellen zusammen mit dem *CCC1*- sowie *pCCC1-pLEU1*-Reporterkonstrukt überexprimiert. Bei Überexpression von Yap1-4 und Yap6 zeigte sich in der Tat eine erhöhte *CCC1* Promotoraktivität (Abb. 2-14 C).

Ungeachtet dessen rief Yap5 die stärkste Aktivierung hervor. Deutlich erkennbar wurde die Auswirkung der ähnlichen Yap-Erkennungssequenzen unter Verwendung des Hybridpromotors *pCCC1-pLEU1-LUX* (Abb. 2-14 B). Dieses Resultat liefert eine Erklärung, wie es trotz *YAP5* Deletion zu einer Aktivierung des *CCC1*-Promotors kommen kann. In diesem Fall können die anderen 7 Yap-Familienmitglieder die Expression von *CCC1* bis zu einem gewissen Grad vermitteln.

### 2.2.2 *In vitro* Charakterisierung des Fe/S-Clusters von Yap5

Die Unabhängigkeit von der CIA-, aber Abhängigkeit von der ISC-Maschinerie war ein erstes Indiz auf die Koordination eines  $[\text{2Fe-2S}]$ -Clusters durch Yap5. Zur biochemischen Charakterisierung des Fe/S-Clusters wurde die Aktivator-domäne von Yap5 mit einem N-terminalen His-tag fusioniert, rekombinant in *E. coli* exprimiert und mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie gereinigt (Abb. 2-15 A).



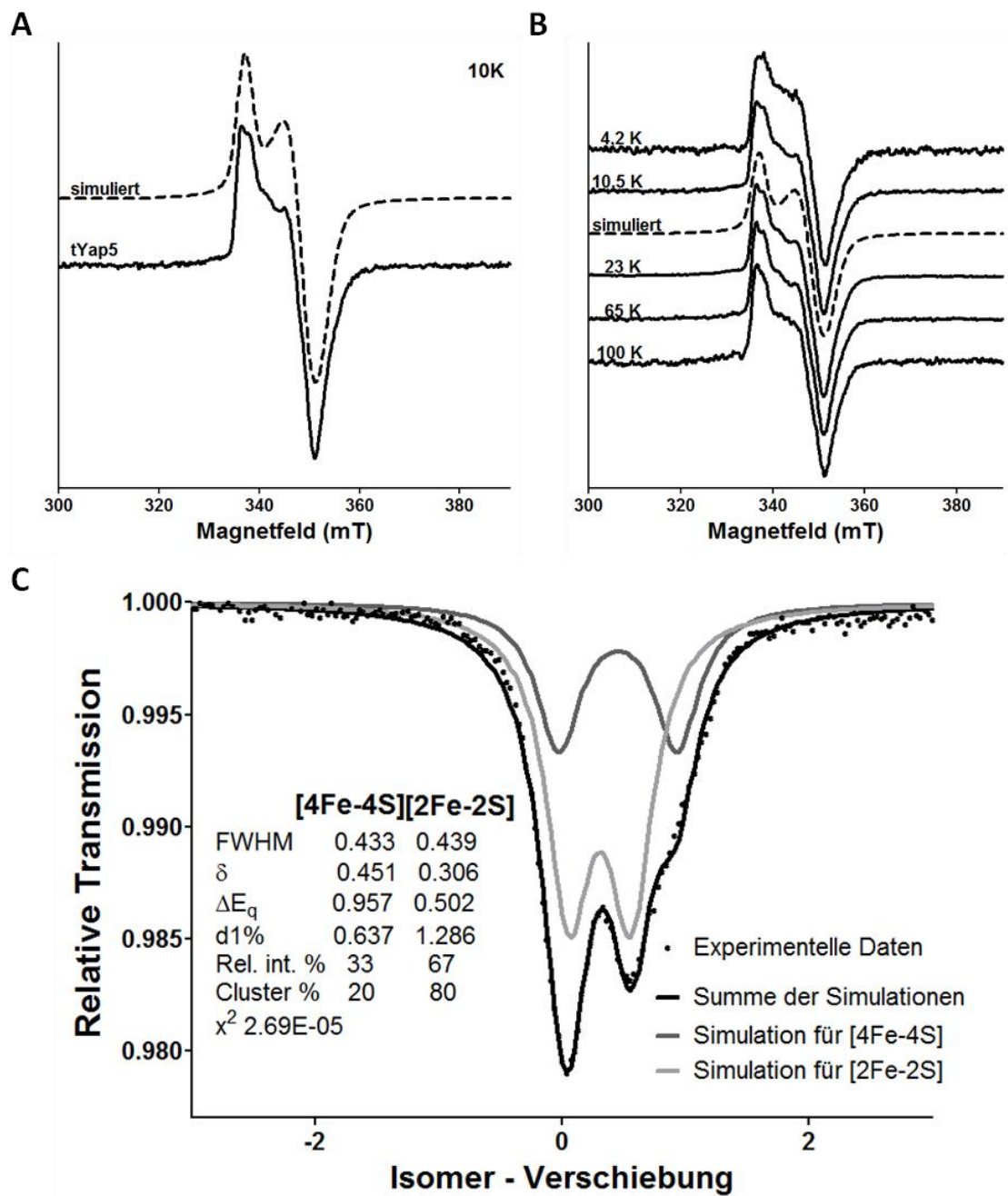
**Abb. 2-15 tYap5 bindet einen Fe/S-Cluster *in vitro*.** **(A)** Fraktionen einer Reinigung von His-tYap5 mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA Affinitätschromatographie. Die Proben wurden in einer SDS PAGE aufgetrennt und mit *Coomassie Brilliant Blue* angefärbt. (1 - nicht induziert; 2 - IPTG induziert; 3 - Zelllysate; 4 - Durchfluss; 5 - 1. Waschschrift; 6 - 2. Waschschrift; 7 - Eluat) **(B)** UV/VIS- und **(C)** CD-Spektrum von tYap5 nach anaerober Reinigung, chemischer Fe/S-Cluster Rekonstitution (rek.) (1 mol Protein zu 2 mol Fe, 2 mol S) und nach Reduktion mit DTT. Der Einschub in B zeigt die Normalisierung der Spektren auf 418 nm. In C wurde das Spektrum vom anaerob aufgereinigten tYap5 um den Faktor 14,5 erhöht.

Rekombinantes tYap5 wurde in einer anaeroben Kammer gereinigt und zeigte eine schwache Färbung. UV/VIS- sowie CD-Absorptionsspektren wurden unter Ausschluss von Sauerstoff aufgezeichnet (Abb. 2-15 B und C). Dabei ergaben sich beim anaerob aufgereinigten tYap5 schwach ausgeprägte, aber Fe/S-Cluster-typische Spektren. Deutlich intensiver wurden die Spektren nach Inkubation mit einem zweifachen molaren Überschuss von  $\text{Fe}^{3+}$  (FAC) und  $\text{S}^{2-}$  ( $\text{Li}_2\text{S}$ ) pro Molekül Protein (1:2 Rekonstitution). Das UV/VIS-Spektrum wies Maxima bei 326 nm und 418 nm, kombiniert mit einer Schulter von 450 – 470 nm, welche charakteristisch für Fe/S-Cluster sind, auf. Ebenfalls typisch für einen Cluster war der Verlust des Absorptionsspektrums nach Behandlung mit DTT. Des Weiteren zeigte das chemisch rekonstituierte Holo-tYap5 ein CD-Spektrum mit Maxima bei 306 nm und 422 nm, einem Plateau zwischen 450 nm – 475 nm und ein Minimum bei 352 nm.

Die Spektren des anaerob aufgereinigten und des rekonstituierten tYap5 glichen sich, abgesehen von der Intensität, sehr stark, wenn sie auch nicht völlig identisch waren. Diese Spektren bestätigen die Ähnlichkeit zwischen dem *in vitro* rekonstituierten und dem aus *E.coli* isolierten *in vivo* tYap5. Sowohl die UV/VIS- als auch die CD-Spektroskopie belegen die Bindung eines Fe/S-Clusters an tYap5.

Zur exakten Bestimmung des Cluster-Typs wurden Elektronenspinresonanz- (ESR) und Mößbauer-Spektroskopie verwendet (Abb. 2-16). Das Dithionit-reduzierte ESR-Spektrum des 1:2 rekonstituierten tYap5 zeigte bei 10 K ein rhombisches Spektrum mit  $g$ -Werten von 2,001, 1,935 und 1,922. Diese ähneln den veröffentlichten Werten des  $[\text{2Fe-2S}]^{1+}$ -Clusters von Dre2 (Zhang *et al.* 2008). Das ESR-Spektrum von tYap5 blieb bei einer Temperatur bis zu 100 K stabil. Diese Temperaturstabilität ist ein wichtiger Beleg für einen  $[\text{2Fe-2S}]$ -Cluster, da ESR-Spektren von  $[\text{4Fe-4S}]$ -Clustern nur bei niedrigen Temperaturen ( $< 10$  K) sichtbar sind (Abb. 2-16 A und B). Die Mößbauer-Spektroskopie lieferte ein ähnliches Resultat. Das Nullfeld Mößbauer-Spektrum von  $^{57}\text{Fe}$ -rekonstituierten tYap5 zeigte 2 Sub-Spektren, I und II, im Verhältnis 4:1. Diese wiesen typische Parameter von Valenzelektronen eines  $\text{Fe}^{3+}$  in oxidierten  $[\text{2Fe-2S}]^{2+}$ -Cluster und von  $\text{Fe}^{2+/3+}$  in  $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster auf (Beinert *et al.* 1997, Dunham *et al.* 1971, Schünemann & Winkler 2000). Aus der Datenanpassung ergibt sich für das rekonstituierte tYap5 ein Verhältnis von 80 %  $[\text{2Fe-2S}]$ - zu 20 %  $[\text{4Fe-4S}]$ -Cluster. Zusammengefasst zeigen diese spektroskopischen Daten, dass tYap5 hauptsächlich einen  $[\text{2Fe-2S}]$ -Cluster bindet.

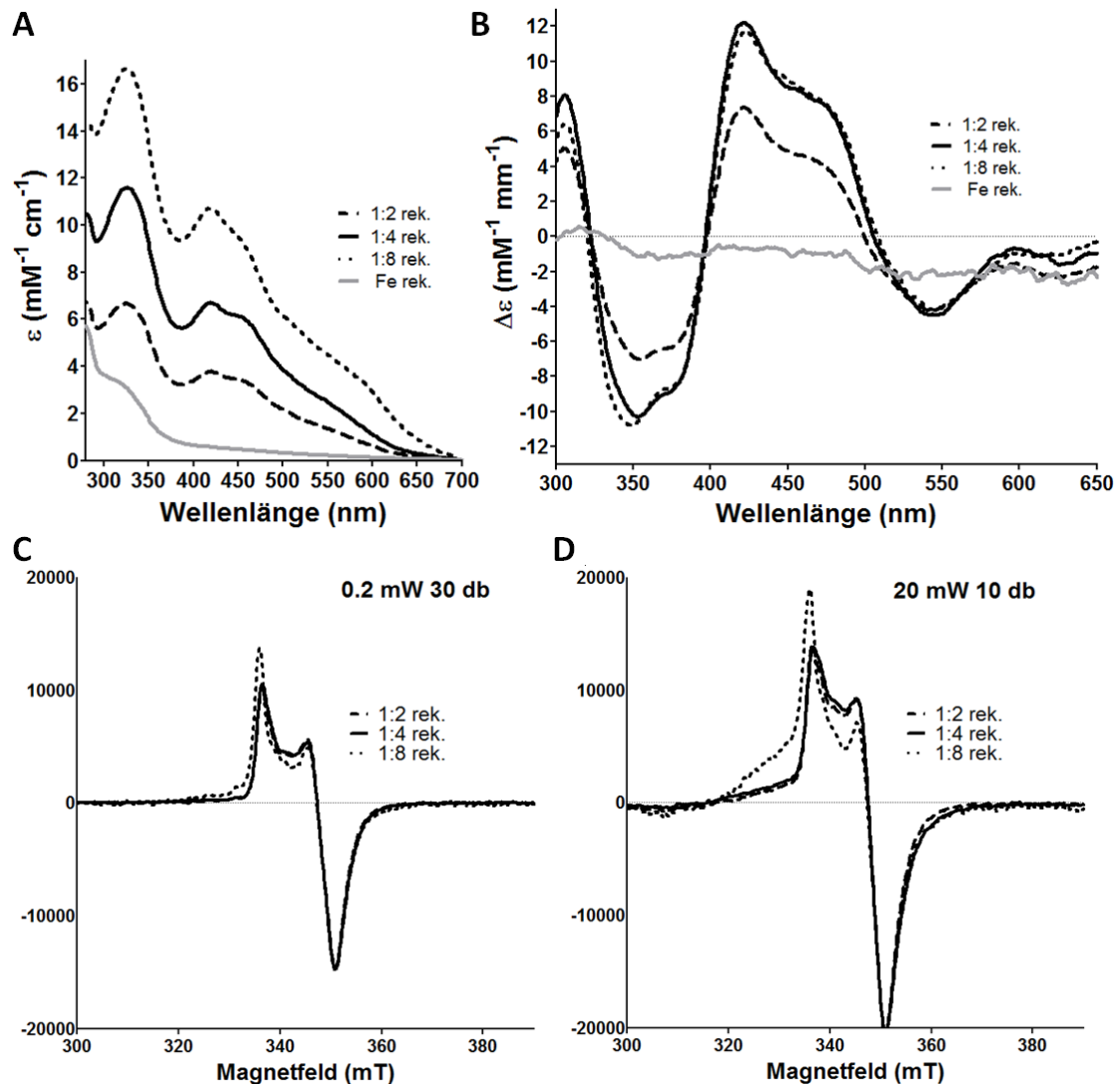




**Abb. 2-16 tYap5 koordiniert [2Fe-2S]-Cluster.** (A) Tieftemperatur ESR-Spektrum des rekonstituierten, Dithionit-reduzierten tYap5 und eine Simulation des Spektrums eines [2Fe-2S]-Clusters. Aufgenommen bei 10 Kelvin. (B) ESR-Spektren bei erhöhten Temperaturen. Die Temperaturstabilität ist typisch für einen [2Fe-2S]-Cluster. (C) Nullfeld Mößbauer-Spektrum des mit  $^{57}\text{Fe}$ -Ionen und  $\text{S}^{2-}$  rekonstituierten tYap5 bei 80 K. Die beiden grauen Linien zeigen Simulationen für Subspektren I ( $[\text{2Fe-2S}]^{2+}$ ) und II ( $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ ) an.

Zur Optimierung der Rekonstitution des Holo-tYap5, wurde das Protein mit 2-facher bzw. 4-facher und 8-facher molarer Menge von  $\text{Fe}^{3+}$ - und  $\text{S}^{2-}$ -Ionen, im Vergleich zur molaren Proteinkonzentration rekonstituiert (1:2; 1:4 und 1:8 Rekonstitution). Dabei zeigte sich, dass eine größere Menge an Eisen- und Sulfidionen eine Erhöhung der

Intensität des UV/VIS-Spektrums bewirkte, der Charakter der Spektren sich aber nicht wesentlich änderte (Abb. 2-17 A). Bei den CD-Spektren wurde allerdings eine Sättigung des Signals bei einer 1:4 Rekonstitution deutlich (Abb. 2-17 B). Dies könnte bedeuten, dass die optimalen Bedingungen zur Rekonstitution des [2Fe-2S]-Clusters von tYap5 bei einem molaren Verhältnis von 1:4 liegen.



**Abb. 2-17 tYap5 bindet [2Fe-2S]-Cluster nach Rekonstitution mit  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{S}^{2-}$ -Ionen.** (A) UV/VIS- und (B) CD-Spektren des chemisch rekonstituierten tYap5 in molaren Verhältnissen von 1 Protein zu 2-, 4- und 8-facher molarer Menge Eisen- und Sulfidionen, sowie 1 Protein zu 2-fachen Eisen- ohne Sulfidionen Menge (Fe rek.) (C) Tieftemperatur ESR-Spektrum der 1:2, 1:4 und 1:8 rekonstituierten, DT-reduzierten tYap5 Proteine, aufgenommen bei 0,2 mW, 30 db. (D) ESR-Spektrum aufgenommen bei erhöhter Mikrowellenleistung (20 mW, 10 db).

Die ESR-Spektren des 1:2 und 1:4 rekonstituierten tYap5 waren sehr ähnlich. Hingegen zeigte das Spektrum des 1:8 rekonstituierten Proteins deutliche Veränderungen, die auf die Anwesenheit neuer Spezies hindeutete, deren spektrale Charakteristika von denen eines [2Fe-2S]-Clusters abwichen. Der 8-fache Überschuss von Eisen- und Sulfidionen verursachte offensichtlich die unspezifische Bindung von Fe-Ionen und eine Tendenz zur Bildung eines [4Fe-4S]-Clusters an tYap5, wohingegen eine Rekonstitution im Verhältnis 1:4 die intensivsten und klarsten Spektren hervorbrachte (Abb. 2-17). Es wird daher angenommen, dass das 1:4 rekonstituierte tYap5 dem physiologischen Holo-Protein am nächsten kommt. Dieses bindet einen oder mehrere [2Fe-2S]-Cluster.

Des Weiteren wurde tYap5 ohne Sulfid mit zweifacher molarer Menge an Eisenionen rekonstituiert. Das CD-Spektrum zeigte keine charakteristischen Signale (Abb. 2-17 B). Das UV/VIS-Spektrum wies eine Absorption bei 320 nm auf (Abb. 2-17 A). Dies legt nahe, dass tYap5 geringe Mengen an Eisen in ionischer Form binden kann.

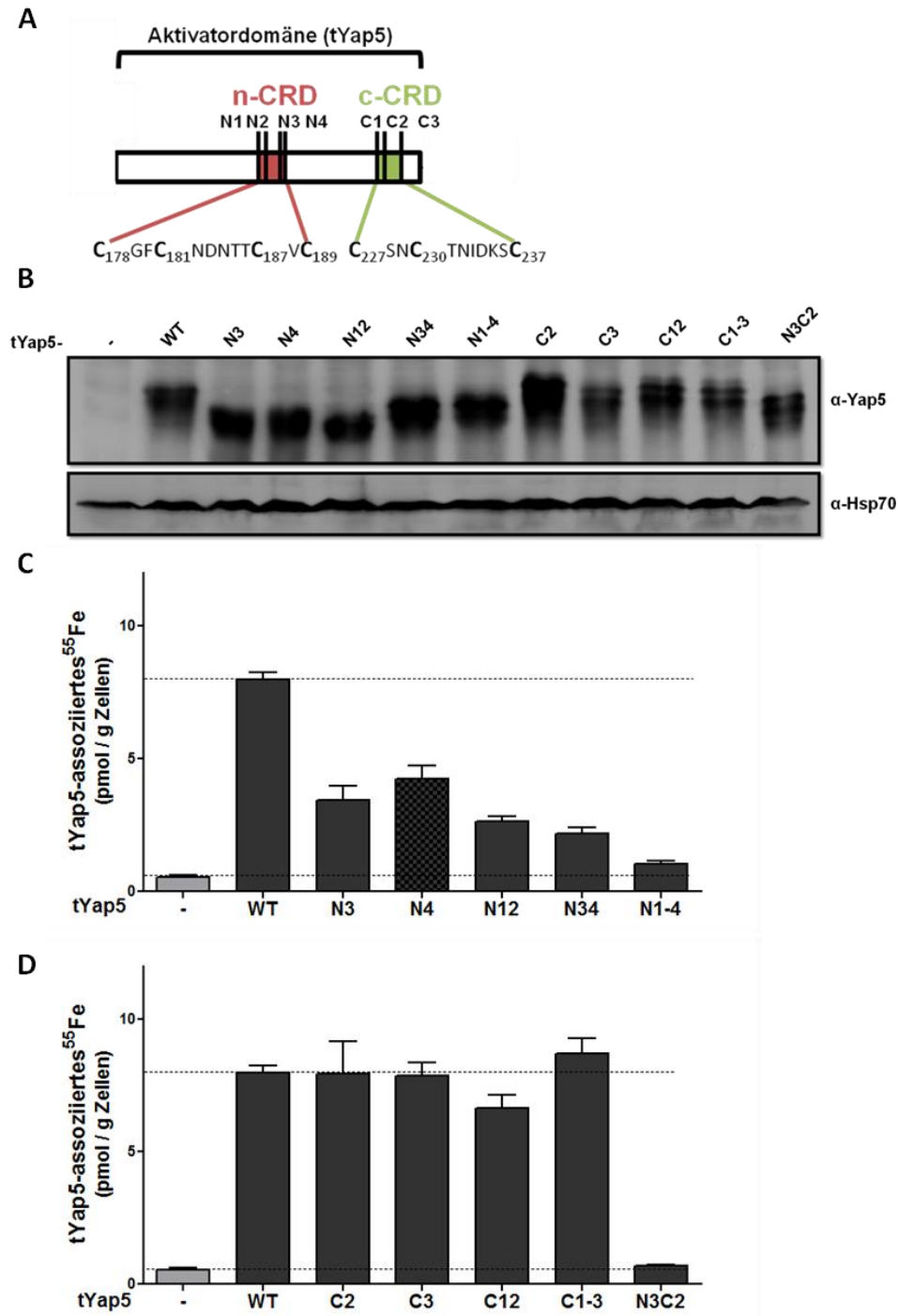
Zusammengefasst zeigten UV/VIS-, CD- als auch die ESR- und Mößbauer-Spektroskopie beim Holo-tYap5 stets typische Charakteristika von [2Fe-2S]-Clustern.

### 2.2.3 tYap5 bindet einen Fe/S-Cluster Sensor an der N-terminalen CRD

Zur Identifizierung der Fe/S-Cluster-kordinierenden Cysteine in tYap5 wurden einzelne und Kombinationen der Cysteine in der n-CRD sowie in der c-CRD durch Alanin substituiert (Abb. 2-18 A). Alle Yap5 Mutationen konnten in der Hefe stabil überexprimiert werden und erlaubten so die Fe/S-Cluster Bindung an diesen tYap5 Varianten *in vivo* zu bestimmen (Abb. 2-18 B).

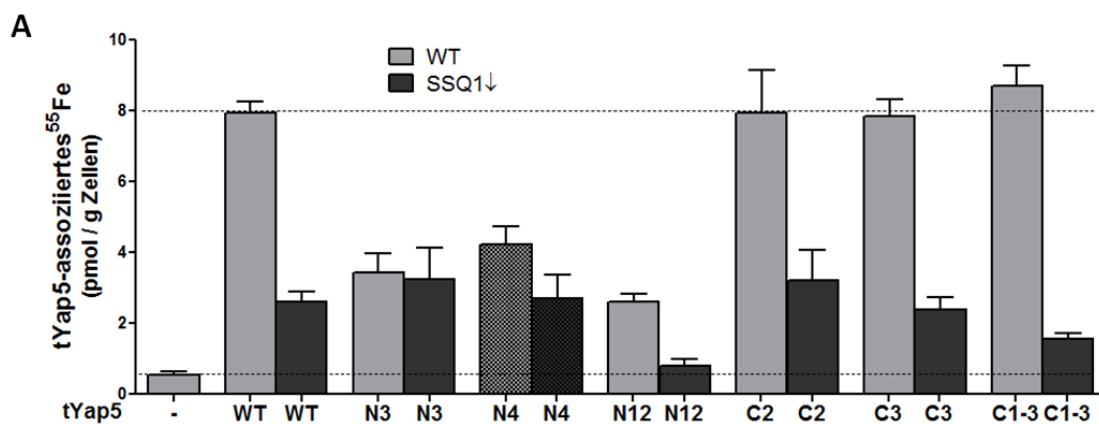
Einzelmutationen des 3. oder 4. Cysteins in der n-CRD (N3 und N4) ließ die *de novo* Inkorporation des  $^{55}\text{Fe}$  in tYap5 auf 57 % bzw. 47 % im Vergleich zum Wildtyp sinken. Bei der Kombination zweier Alanin-Substitutionen verringerte sich die Eisenbindung bei N1N2 auf 33 % und bei N3N4 auf 27 %. Die Mutation aller N-terminalen Cysteine (N1-4) minimierte den  $^{55}\text{Fe}$ -Einbau auf 13 % des Wildtyp-Proteinlevels, was dem unspezifischen Hintergrundsignal von Zellen mit dem Leervektor nahe kam (Abb. 2-18 C). Im Vergleich dazu verursachten Substitutionen in der c-CRD keine wesentlichen Verluste der  $^{55}\text{Fe}$ -Bindung an tYap5, selbst bei simultaner Substitution aller drei Cysteine

durch Alanin (C1-3) (Abb. 2-18 D). Zusammengenommen belegen diese Ergebnisse, dass tYap5 *in vivo* einen [2Fe-2S]-Cluster in der N-terminalen CRD bindet.



**Abb. 2-18 tYap5 bindet einen Fe/S-Cluster an der n-CRD *in vivo*.** (A) Schematische Darstellung von tYap5 (s. Abb. 2-11). (B) Western Blot Analysen der Expressionslevel der angegebenen Cystein-Mutanten von tYap5 im Wildtyp. Hsp70 diente als Ladekontrolle. (C, D) Die <sup>55</sup>Fe-Bindung an die angegebenen tYap5 Variationen in der n-CRD (C) und in der c-CRD (D) wurden wie in Abb. 2-12 beschrieben bestimmt. Bis auf die Einzelmutation N4 (Mutation zum Serin) handelte es sich stets um Cystein zu Alanin Substitutionen. Fehlerbalken geben den SEM an (n>4).

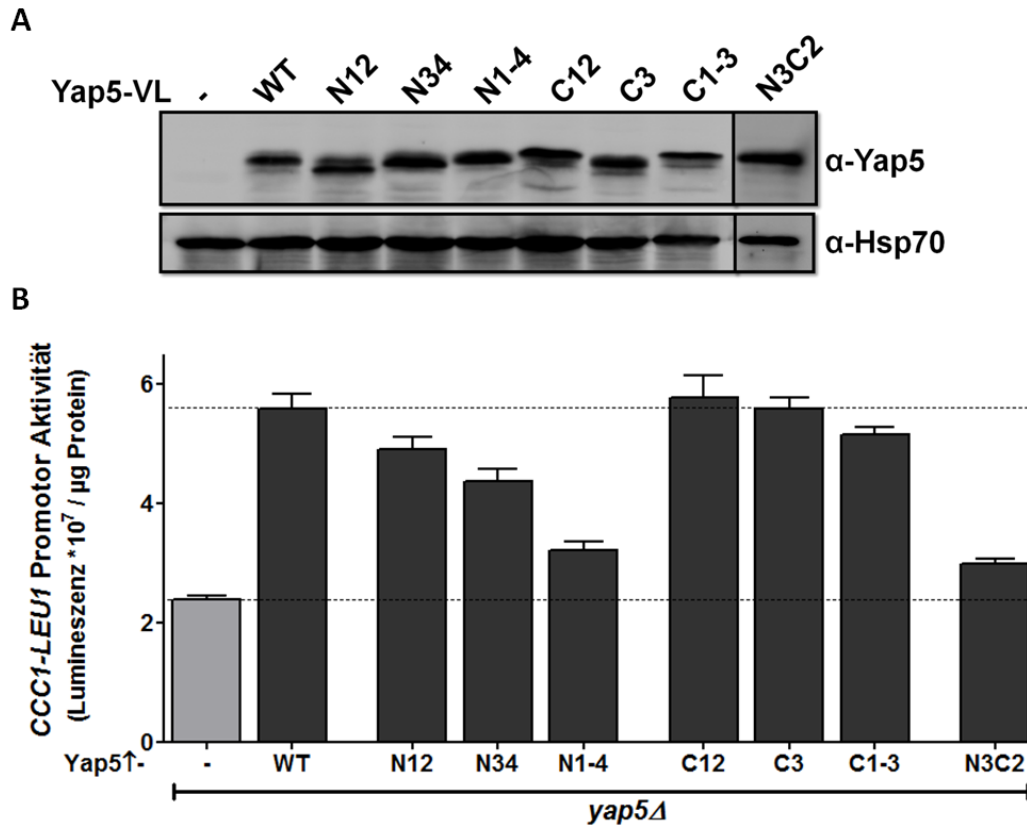
Im Gegensatz dazu steht der vollständige Verlust der  $^{55}\text{Fe}$ -Bindung bei der Kombination einer einzelnen N-terminalen und einer einzelnen C-terminalen Mutation (N3C2) (Abb. 2-18 D). Fehlen Cysteinreste der c-CRD zusätzlich zu einem N-terminalen Cysteinrest so geht die  $^{55}\text{Fe}$ -Inkorporation in tYap5 verloren. Dies könnte zum einen bedeuten, dass die Cysteinreste der c-CRD eine kompakte Proteinkonformation vermitteln, die eine restliche  $^{55}\text{Fe}/\text{S}$ -Bindung in tYap5 mit Mutationen in der n-CRD stabilisieren. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass der Fe/S-Cluster des tYap5 bei N-terminalen Cysteinmutationen über Cysteine der c-CRD rekrutiert wird.



**Abb. 2-19 (A)** Die  $^{55}\text{Fe}$ -Bindung an tYap5 und an die angegebenen Cysteinvarianten von tYap5 wurde in WT und in Ssq1-depletierten (SSQ1↓) Zellen wie in Abb. 2-12 beschrieben bestimmt. Bis auf die Einzelmutteration N4 (Mutation zum Serin) handelte es sich stets um Cystein zu Alanin Substitutionen. Fehlerbalken geben den SEM an ( $n>3$ ).

Zur Untersuchung, ob die  $^{55}\text{Fe}$ -Assoziation an die Cysteinmutanten von tYap5 auf der Bindung eines Fe/S-Clusters beruhen, wurden diese in Gal-SSQ1 Zellen transformiert. Nach der Depletion von SSQ1 auf ein kritisches Niveau zeigte tYap5 mit Substitutionen in c-CRD ebenfalls einen Verlust der  $^{55}\text{Fe}$ -Bindung auf ein ähnliches Niveau wie Wildtyp-tYap5 in Gal-SSQ1 Zellen. Dies belegt, dass die  $^{55}\text{Fe}$ -Bindung in den C-terminalen Cysteinmutanten (C1-3) auf einen Fe/S-Cluster, der in der n-CRD gebunden ist, zurückzuführen ist. Die  $^{55}\text{Fe}$ -Bindung der tYap5 Variante N3 schien dagegen Ssq1-unabhängig zu sein, was eine Bindung von Eisen vermuten lässt. Dagegen zeigte sich ein weiterer Verlust der  $^{55}\text{Fe}$ -Bindung auf tYap5/N12 in der Ssq1-depletierten Zelle hin zum Leervektorniveau (Abb. 2-19). Dies wiederum deutet auf einen gebundenen Fe/S-Cluster in tYap5/N12 hin, der unter Depletion der ISC-Komponente vollständig verloren geht. Der Charakter des restlichen gebundenen Eisens in den Doppelmутanten der

n-CRD bleibt somit offen. Wahrscheinlich wäre, dass tYap5 die Cysteine der c-CRD zur unspezifischen Eisenionen-Bindung benutzt.



**Abb. 2-20 Die Fe/S-Cluster Bindung an der n-CRD ist entscheidend für die transkriptionelle Aktivität von Yap5. (A)** Western Blot Analyse auf das Expressionsniveau der angeführten Cystein-Mutationen von Yap5 in *yap5 $\Delta$*  Zellen, Hsp70 diente als Ladekontrolle. **(B)** *yap5 $\Delta$*  Zellen wurde mit den angegebenen Yap5-Mutanten und mit einem *pCCC1-pLEU1-LUX* Plasmid transformiert, 12 h in Minimal-medium mit 1 mM FeCl<sub>2</sub> angezogen und die Biolumineszenz der Luciferase Aktivität in Zellextrakten bestimmt. Fehlerbalken geben den SEM an (n>4).

Zur Untersuchung der Transkriptionsaktivität von Yap5-Mutanten wurden Cysteine ebenfalls im Volllängen (VL) Yap5 zu Alanin substituiert. Diese Konstrukte wurden zusammen mit dem Reporterkonstrukt *pCCC1-pLEU1-LUX* (s. Abb. 2-13 B) in *yap5 $\Delta$*  Zellen transformiert. Nach dem Wachstum der Zellen unter Eisensupplementation (1 mM FeCl<sub>2</sub>) zeigte sich, dass die Überexpression von Yap5, im Vergleich zu *yap5 $\Delta$*  Zellen mit einem Leervektor zur 2,4-fachen Induktion des *pCCC1-pLEU1*-Promotors führte (Abb. 2-20 B). Weiterhin wurde mit steigender Anhäufung von Mutation in der n-CRD von Yap5 eine parallele Verringerung der Aktivierung des *pCCC1-pLEU1*-Hybridpromotors sichtbar. So zeigte Yap5/N12 einen Verlust der induzierten Promotor-

stärke um ca. 20 % und N34 um ca. 40 % verglichen zum WT. Im Falle von Yap5/N1-4 sank die Induktion des Promotors um 75 %. Mutationen in c-CRD hingegen verursachten keinen wesentlichen Verlust der Promotorstärke von *pCCC1-pLEU1* (Abb. 2-20 B). In guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der *in vivo*  $^{55}\text{Fe}$ -Bindung (s. Abb. 2-18) zeigte sowohl N1-4 als auch die Kombination von N3C2 (20 % Restaktivität) die geringste Induktion des *pCCC1-pLEU1*-Hybridpromotors.

Zusammengefasst belegt der Verlust der  $^{55}\text{Fe}$ -Bindung von tYap5/N1-4 *in vivo*, der mit einem Verlust der transkriptionellen Aktivität von Yap5/N1-4 einhergeht, dass die Fe/S-Cluster Bindung an der n-CRD, essentiell an der Regulation von Yap5 beteiligt ist. Der Fe/S-Cluster an n-CRD fungiert somit als Eisensensor für Yap5 *in vivo*.

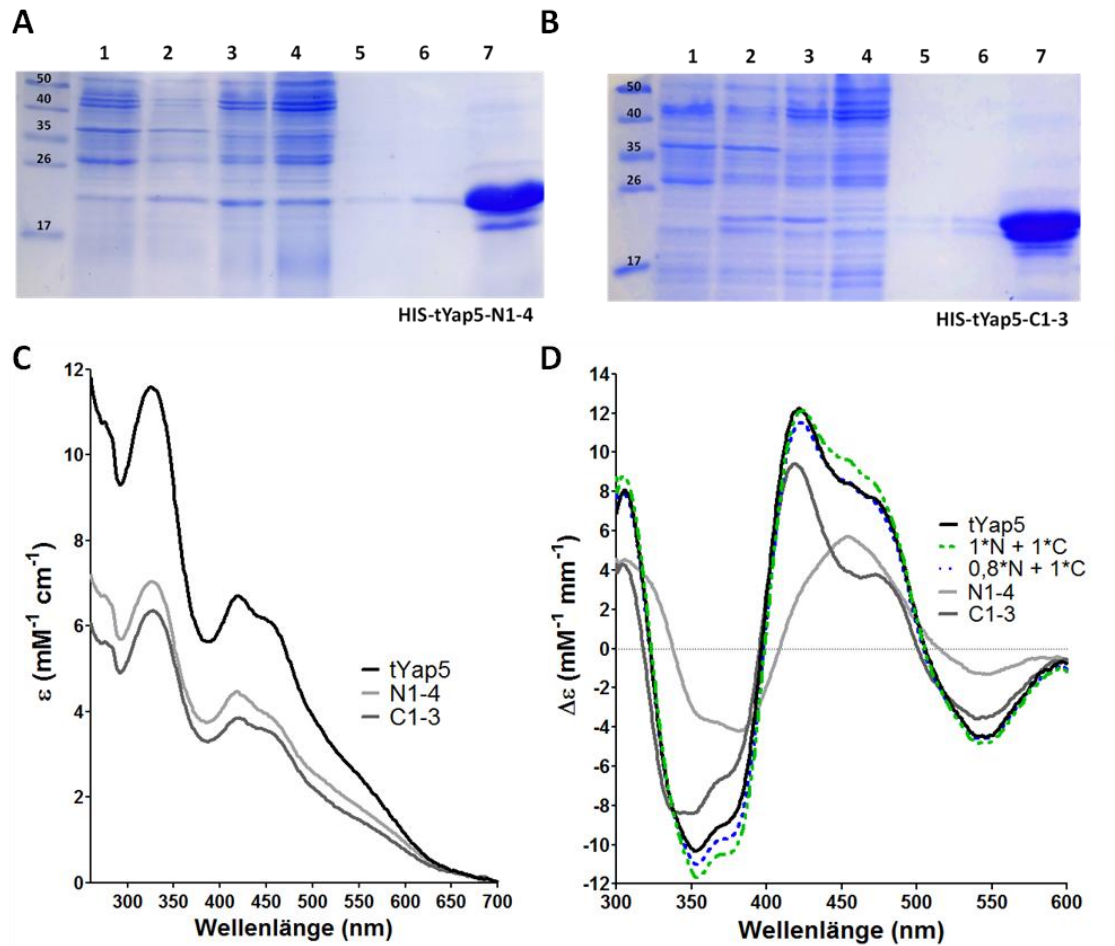
#### 2.2.4 Gereinigtes tYap5 bindet einen Fe/S-Cluster am n- und c-CRD

Zur weiteren Untersuchung der Fe/S-Cluster Bindung an Yap5 wurden die tYap5 Varianten N1-4 und C1-3, in denen alle Cysteine der n- bzw. c-CRD zu Alaninresten mutiert waren, in *E. coli* rekombinant exprimiert und nach der Aufreinigung biochemisch charakterisiert (Abb. 2-21 A und B). Die zuvor beschriebenen *in vivo* Ergebnisse zeigten die Bindung eines Fe/S-Clusters als Sensor an der N-terminalen CRD. Somit sollte sich die C1-3-Mutante wie die Holo-Form von tYap5 verhalten. Entsprechend sollte Yap5 bei der Deletion der Cluster-koordinierenden Liganden N1-4 in der Apoform vorliegen.

Übereinstimmend mit den *in vivo* Daten zeigte tYap5/C1-3 nach chemischer Rekonstitution ein UV/VIS-Spektrum, das mit dem von tYap5 (WT) nahezu identisch, aber weniger intensiv war. Ebenfalls ähnelten sich die CD-Spektren der beiden Proteine, wobei jedoch das Plateau (450 nm – 475 nm) in tYap5 weniger ausgeprägt war als in Yap5/C1-3 (Abb. 2-21 C und D). Des Weiteren war das ESR-Spektrum von tYap5/C1-3 mit *g*-Werte von 2.002, 1.936 und 1.923 von dem des Wildtyps kaum zu unterscheiden. Es gab keine Hinweise auf die Anwesenheit von anderen Spezies bei Subtraktion der Spektren von unterschiedlichen Mikrowellenleistungen oder im Differenzspektrum zwischen tYap5 und tYap5/C1-3. Da die Spektren von tYap5 und tYap5/C1-3 von der Mikrowellenleistung unabhängig waren, muss es sich bei diesem Fe/S-Cluster um einen [2Fe-2S]-Cofaktor handeln (Abb. 2-22 A). Diese *in vitro* Charakterisierung von



tYap5/C1-3 ist im Einklang mit den Analysen *in vivo* und belegen, dass Yap5 einen [2Fe-2S]-Cluster an der n-CRD Domäne bindet.

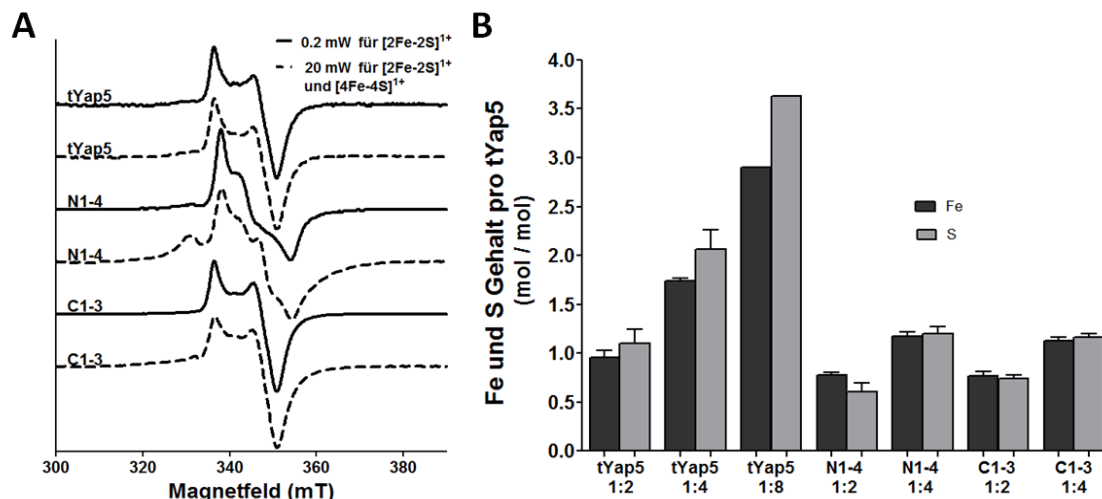


**Abb. 2-21 Die n-CRD und die c-CRD koordinieren einen Fe/S-Cluster *in vitro*.** (A) Fraktionen einer Reinigung von His-tYap5/N1-4 und (B) tYap5/C1-3 mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA Affinitätschromatographie. Die Proben wurden in einer SDS PAGE aufgetrennt und mit *Coomassie Brilliant Blue* angefärbt. (1 - nicht induziert; 2 - IPTG induziert; 3 - Zellysat; 4 - Durchfluss; 5 - 1. Waschschrift; 6 - 2. Waschschrift; 7 - Eluat) (C) UV/VIS- und (D) CD-Spektren des 1:4 rekonstituierten tYap5 (WT), N1-4 und C1-3 wurden unter Ausschluss von Sauerstoff aufgezeichnet.

Im Gegensatz zu den Erwartungen aus den *in vivo* Experimenten zeigte jedoch auch das rekombinant exprimierte tYap5/N1-4 nach chemischer Rekonstitution eine rötlich-braune Farbe und ein augenscheinlich ähnliches, aber wiederum weniger intensives UV/VIS-Spektrum wie tYap5 (WT) (Abb. 2-21 C). Das CD-Spektrum von tYap5/N1-4 zeigte ein breites Maximum bei 455 nm und war von schwächerer Intensität (Abb. 2-21 D). Auf dem ersten Blick scheint dieses Spektrum gänzlich anders zu sein als das des Wildtyp tYap5. Addierte man allerdings die Spektren der n- und c-CRD Mutanten



im Verhältnis 1 zu 1 bzw. 0,8 zu 1, so entstand ein dem Wildtyp tYap5 sehr ähnliches Spektrum. Dies ist ein deutliches Indiz für die Bindung zweier Cluster an tYap5 *in vitro*.



**Abb. 2-22 Gereinigtes tYap5/N1-4 und tYap5/C1-3 koordinieren unterschiedliche Fe/S-Cluster. (A)** Tieftemperatur ESR-Spektren von 1:4 rekonstituierten, Dithionit-reduzierten tYap5, tYap5/N1-4 und tYap5/C1-3 wurden bei 0,2 mW und 20 mW Mikrowellenleistung aufgezeichnet. **(B)** Fe- und S-Anteil in Wildtyp tYap5, tYap5/N1-4 und tYap5/C1-3, nach Rekonstitution mit den angegebenen molaren Verhältnissen von Protein zu Fe und S. Der  $\text{Fe}^{2+/3+}$ - und  $\text{S}^{2-}$ -Gehalt wurde kolorimetrisch bestimmt. Fehlerbalken geben den SEM an ( $n > 3$ ).

Die ESR-Spektren von tYap5/N1-4 zeigten ein völlig anders geartetes Spektrum als das Wildtyp-Protein (Abb. 2-22 A). Unter Verwendung von Bedingungen, die sowohl [4Fe-4S]- als auch [2Fe-2S]-Cluster detektieren (20 mW Mikrowellenleistung), zeigte sich bei tYap5/N1-4 eine Mischung aus zwei Spezies. Da sich die ESR-Spektren bei unterschiedlichen Mikrowellensättigungen (0,2 mW und 20 mW) gut unterscheiden, lassen sich die  $g$ -Werte über Differenzspektren identifizieren. Die relativ scharfe Hauptspezies (ca. 70 %) hat ein rhombisches ESR-Spektrum mit  $g$ -Werten von 1.995, 1.957 und 1.903. Bei dieser Spezies muss es sich um einen [2Fe-2S]-Cluster handeln. Bei höherer Mikrowellenleistung (20 mW) wurde das relativ breite rhombische ESR-Spektrum mit  $g$ -Werten von 2.037, 1.935 und 1.886 sichtbar. Vor allem das Maximum mit dem  $g$ -Wert 2.037 (d.h. bei 332 mT) ist nicht nur im Differenzspektrum sondern auch im Spektrum, das bei einer Mikrowellenleistung von 20 mW aufgenommen wurde deutlich erkennbar. Diese Spezies ist weder bei tYap5 noch bei tYap5/C1-3 erkennbar. Die Tatsache, dass das ESR-Spektrum des Wildtyp tYap5 nicht aus den beiden Mutanten zusammengesetzt ist, lässt vermuten, dass beide Cluster auf dem Protein sehr nah

beieinander liegen, so dass eine magnetische Kopplung zwischen beiden Clustern auftritt, die zur teilweisen Auslöschung des ESR-Spektrums des c-CRD Clusters führt (9-15 Å) (Mathews *et al.* 1974).

Einen weiteren Hinweis auf den Cluster-Typ konnten kolorimetrische Bestimmungen des  $\text{Fe}^{2+/3+}$ - und  $\text{S}^{2-}$ -Gehalts der rekombinanten Yap5 Proteine liefern. Die Bestimmung des an Holo-tYap5 gebundenen  $\text{Fe}^{2+/3+}$ - und  $\text{S}^{2-}$ -Ionen bei der 1:2 Rekonstitution von tYap5 zeigte 1 Eisen- und 1 Sulfidion pro Monomer Protein. Bei einer Rekonstitution von tYap5 unter optimalen Rekonstitutionsbedingungen (s. Abb. 2-17) bei einem molaren Verhältnis von 1:4 stieg der Anteil auf 1,7 Eisen- und 2,1 Sulfidionen pro Monomer an. Bei den beiden Mutanten tYap5/N1-4 und tYap5/C1-3 ergab sich bei einer Rekonstitution im Verhältnis 1:2 0,61 – 0,77 und im Verhältnis 1:4 1,12 – 1,2 Eisen- / Sulfidionen pro Monomer (Abb. 2-22 B). Der  $\text{Fe}^{2+/3+}$ - und  $\text{S}^{2-}$ -Ionen Gehalt von ca. 1 Ion / Monomer legte nahe, dass beide Mutanten je einen [2Fe-2S]-Cofaktor pro Dimer binden. Dieser Fe/S-Cofaktor könnte auf einem der beiden Monomere binden, oder einen gebrückten Cluster zwischen zwei Monomeren bilden, wie dies auch bei Grx4 nachgewiesen wurde (Muhlenhoff *et al.* 2010). Da es eher unwahrscheinlich ist, dass ein symmetrisches Homodimer nur einen Cluster auf einer seiner beiden Hälften bindet, ist eher anzunehmen, dass beide Mutanten (tYap5/N1-4 und tYap5/C1-3) je einen gebrückten [2Fe-2S]-Cluster binden. Dies, der doppelte  $\text{Fe}^{2+/3+}$ - und  $\text{S}^{2-}$ -Ionen Gehalt sowie das doppelt so intensive UV/VIS-Spektrum des Wildtyp tYap5 im Vergleich zu den Mutanten, deutet darauf hin, dass tYap5 sowohl an der n-CRD als auch an der c-CRD je einen gebrückten [2Fe-2S]-Cluster bindet. Die Möglichkeit einer nicht vollständigen Rekonstitution und somit einer Bindung von mehr als zwei Fe/S-Clustern pro Dimer ist zwar unwahrscheinlich, lässt sich aber aus den bisherigen Daten nicht vollständig ausschließen.

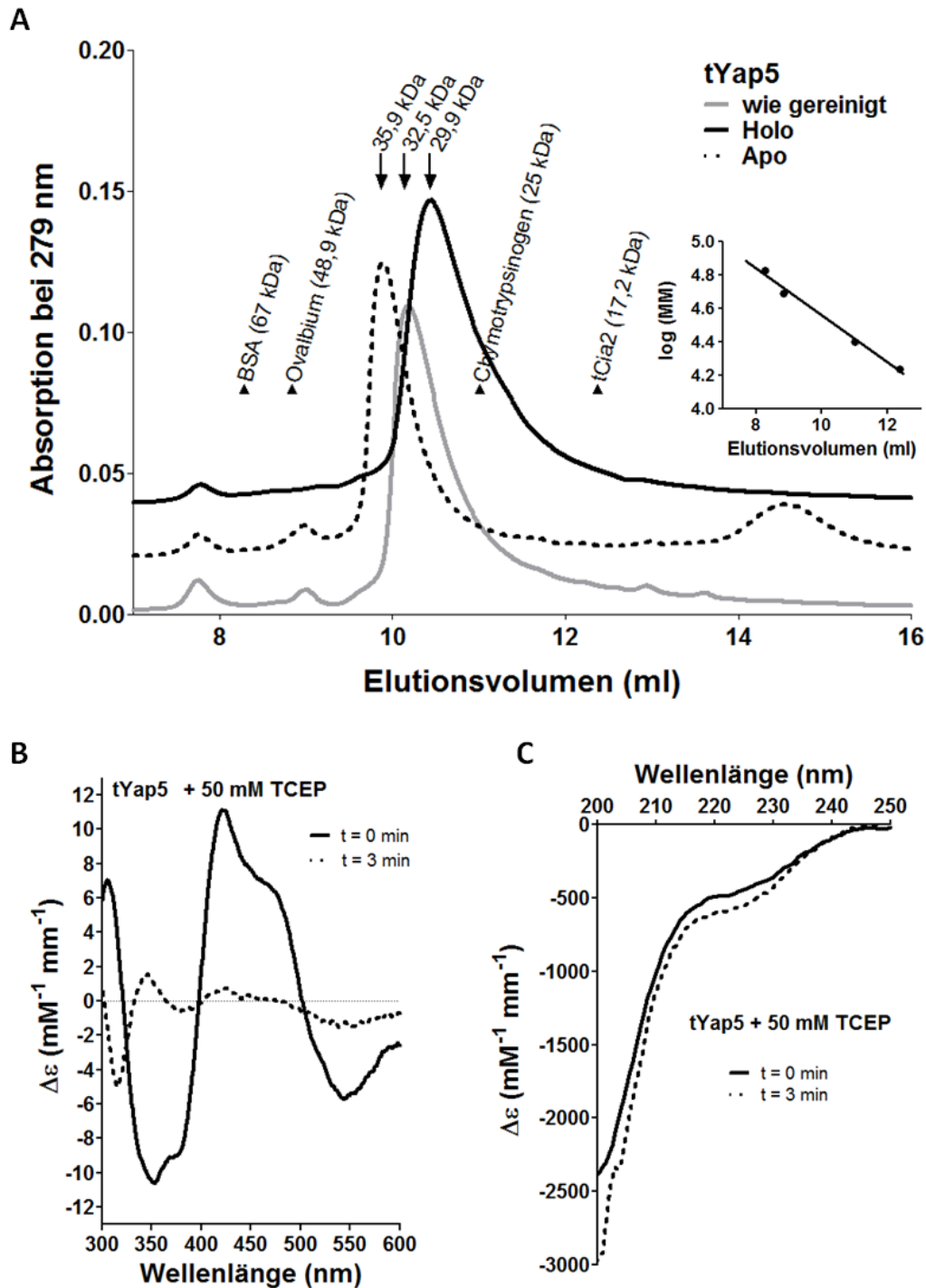
#### 2.2.5 Die Fe/S-Cluster Bindung induziert Konformationsveränderungen in gereinigtem tYap5

Es stellte sich die Frage, wie die Bindung eines Fe/S-Clusters an der n-CRD eine Aktivierung der transkriptionellen Aktivität von Yap5 auslösen könnte. Die Familie der bZIP-Transkriptionsfaktoren binden als Dimere (Homo- oder Heterodimere) an die DNA und nutzen dazu Leucinreste in einer *coil-coil* Struktur (Fujii *et al.* 2000). AP-1 Trans-

kriptionsfaktoren können aber auch ohne DNA bereits als Dimere vorliegen (Glover & Harrison 1995, Hurst 1995, Seldeen *et al.* 2008). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Yap5 eine eisenunabhängige, konstitutive DNA-Bindung in *S. cerevisiae* eingeht (Li *et al.* 2008). Daher kann eine durch die Fe/S-Clusterbindung induzierte Dimerisierung und DNA-Bindung als Mechanismus der Aktivierung von Yap5 weitestgehend ausgeschlossen werden. Die einfachste vorstellbare Funktionsweise von Yap5 wäre daher, dass die Bindung eines gebrückten Fe/S-Clusters eine Konformationsänderung der Aktivatorodomäne von Yap5 vermittelt, die anschließend eine Aktivierung der transkriptionellen Aktivität von Yap5 auslöst. Die geänderte Konformation könnte eine höhere Bindungsaffinität für RNA-Polymerasen oder Transkriptionsinitiationsfaktoren darstellen, und diese in der Nähe von Yap5 rekrutieren. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die molekulare Größe von Apo- und Holo-tYap5 *in vitro* untersucht.

Das aus *E. coli* gereinigte tYap5 zeigte nach Gelfiltrationschromatographie eine Molmasse von ca. 33 kDa (Abb. 2-23 A; wie gereinigt). Da die Molmasse von tYap5 laut Aminosäuresequenz ca. 17 kDa beträgt, bedeutete dies, dass die Aktivatorodomäne von Yap5 ein Homodimer ist. Die Tatsache, dass die Aktivatorodomäne von Yap5 auch ohne die bZIP-Domäne bereits als Dimer, wie das vollständige Protein vorliegt, ermöglicht, Konformationsänderungen an tYap5 zu untersuchen, die auch für das Gesamtprotein von funktioneller Relevanz sein können. Daher wurde die Molmasse des tYap5 Holo-Proteins nach chemischer Rekonstitution durch Gelfiltration bestimmt.

Hierbei zeigte sich, dass die Rekonstitution von tYap5 (Holo) das Laufverhalten auf eine apparente Größe von ca. 30 kDa verringerte. Diese leichte Abnahme in der Größe deutet auf eine kompaktere Konformation des Proteins nach Bindung eines Fe/S-Clusters hin. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Bindung eines gebrückten Fe/S-Clusters zwischen den beiden tYap5-Monomere in der dimeren Aktivatorodomäne diese wie ein Knopf in eine kompaktere, transkriptionell-aktivierende Konformation überführt. Sollte dies zutreffen, so sollte die vollständige Zerstörung des Fe/S-Clusters zu einer offeneren Form von tYap5 und damit zu einer schnelleren Elution in der Gelfiltration führen. Eine Reduktion von tYap5 mit hohen Mengen von TCEP zeigte anhand des CD-Spektrums im sichtbaren Bereich eine vollständige Zerstörung des Fe/S-Clusters auf tYap5 innerhalb weniger Minuten (Abb. 2-23 B). Das CD-Spektrum im UV-Bereich dokumentierte, dass die Sekundärstruktur von tYap5 durch die Behandlung mit TCEP sich nicht wesentlich veränderte (Abb. 2-23 C).

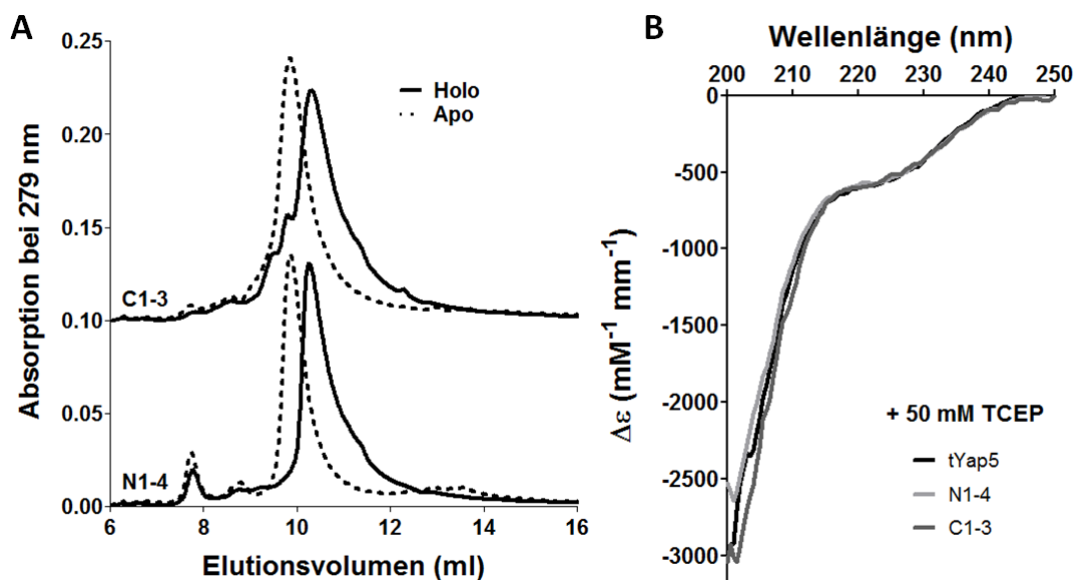


**Abb. 2-23 Yap5 ist ein Dimer, das bei Fe/S-Cluster Bindung eine Konformationsänderung ausführt.** (A) Elutions-Profile von HPLC Gelfiltrationsexperimenten des aufgereinigten, rekonstituierten (Holo) und TCEP reduzierten (Apo) tYap5. Die angegebenen Massen der tYap5 Spezies wurden über eine Kalibrierungskurve bestimmt (s. Einschub in A). Die molekularen Massen und Elutionsvolumina der verwendeten Molmassenstandards sind angegeben. (B, C) Die CD-Spektren von Holo-tYap5 und nach Behandlung mit TCEP wurden im VIS- (B) und UV- (C) Bereich aufgenommen.

Die Molmasse des TCEP-behandelten Apo-Proteins vergrößerte sich im Vergleich zum Holo-Protein um ca. 6 kDa auf 36 kDa. Diese Zunahme der Molmasse belegt, dass Apo-tYap5 eine offenere Konformation, als das rekonstituierte Holo-Protein besitzt. Entsprechend zeigte das nicht rekonstituierte tYap5, das eine Mischung aus Apo- und Holo-Form darstellt, eine Molmasse von 32.5 kDa, was dem Mittel aus den Molmassen der Apo- und der Holo-Form entspricht (Abb. 2-23 A; wie gereinigt). Die Tatsache, dass die Behandlung mit TCEP nicht zum Auftreten einer Monomerfraktion im erwarteten Molmassenbereich von 17 kDa führte, schließt aus, dass die Dimerisierung von tYap5 über Disulfidbrückenbindungen erfolgt.

Zusammengefasst belegen diese Daten, dass die Aktivatordomäne von tYap5 ein Dimer ist und dass die Bindung eines Fe/S-Clusters die Aktivatordomäne von einer offenen in eine geschlossene Form überführt.

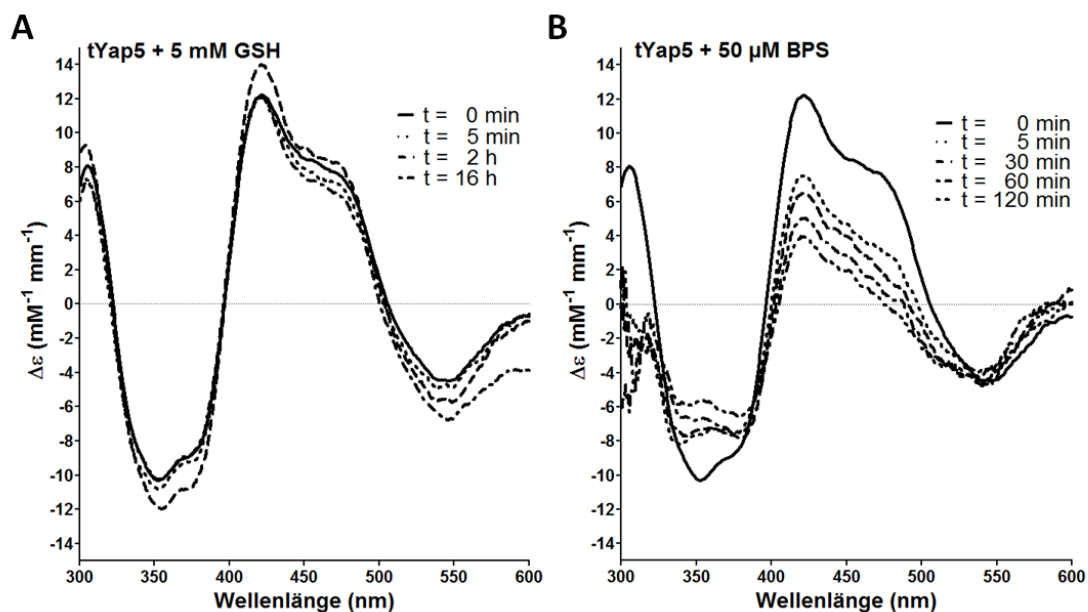
Eine ähnliche Konformationsänderung zeigte sich ebenfalls bei den beiden tYap5 Mutanten, tYap5/N1-4 und tYap5/C1-3 (Abb. 2-24). Dies belegt, dass die Bindung eines der beiden Fe/S-Cluster bereits ausreichend ist, um eine transkriptionell aktive geschlossene Form von tYap5 zu induzieren. Dies stimmt mit den Daten *in vivo* überein, die belegen, dass die Bindung des Fe/S-Cluster Sensors an der n-CRD für eine transkriptionelle Aktivierung von Yap5 ausreichend ist.



**Abb. 2-24 tYap5/N1-4 und tYap5/C1-3 liegen als Dimere vor. (A)** HPLC Gelfiltrationselutions-Profile von rekonstituierten (Holo) und TCEP reduzierten (Apo) tYap5/N1-4 und /C1-3 wurden über Gelfiltrationssäulen wie in Abb. 2-23 bestimmt. **(B)** Ein CD-Spektrum im UV-Bereich wurde von Apo-tYap5 und dessen Mutanten aufgezeichnet.

### 2.2.6 Der Fe/S-Cluster an tYap5 ist empfindlich gegenüber Metallchelatoren

Diese Resultate weisen darauf hin, dass die Aktivator-domäne von Yap5 sowohl in Holo- als auch in Apo-Form als Dimer vorliegt. Die Bindung des Fe/S-Clusters verursacht eine Konformationsänderung hin zu einer kompakteren Struktur, die vermutlich eine transkriptionelle Aktivierung auslösen kann. Dabei stellt sich die Frage nach dem physiologischen Mechanismus, der die Deaktivierung des Transkriptionsfaktors erklärt. Denkbar wären physiologische Reduktionsmittel, wie z.B. Glutathion (GSH). Eine Reduktion des Fe/S-Clusters könnte zu dessen Dissoziation führen und somit einen Mechanismus der transkriptionellen Deaktivierung darstellen. Ein weiterer möglicher Mechanismus wäre der Verlust des Fe/S-Clusters aufgrund geringer Eisenkonzentrationen. Im *in vitro* Experiment lässt sich ein Eisenmangel durch die Verwendung des Eisenchelators BPS simulieren.

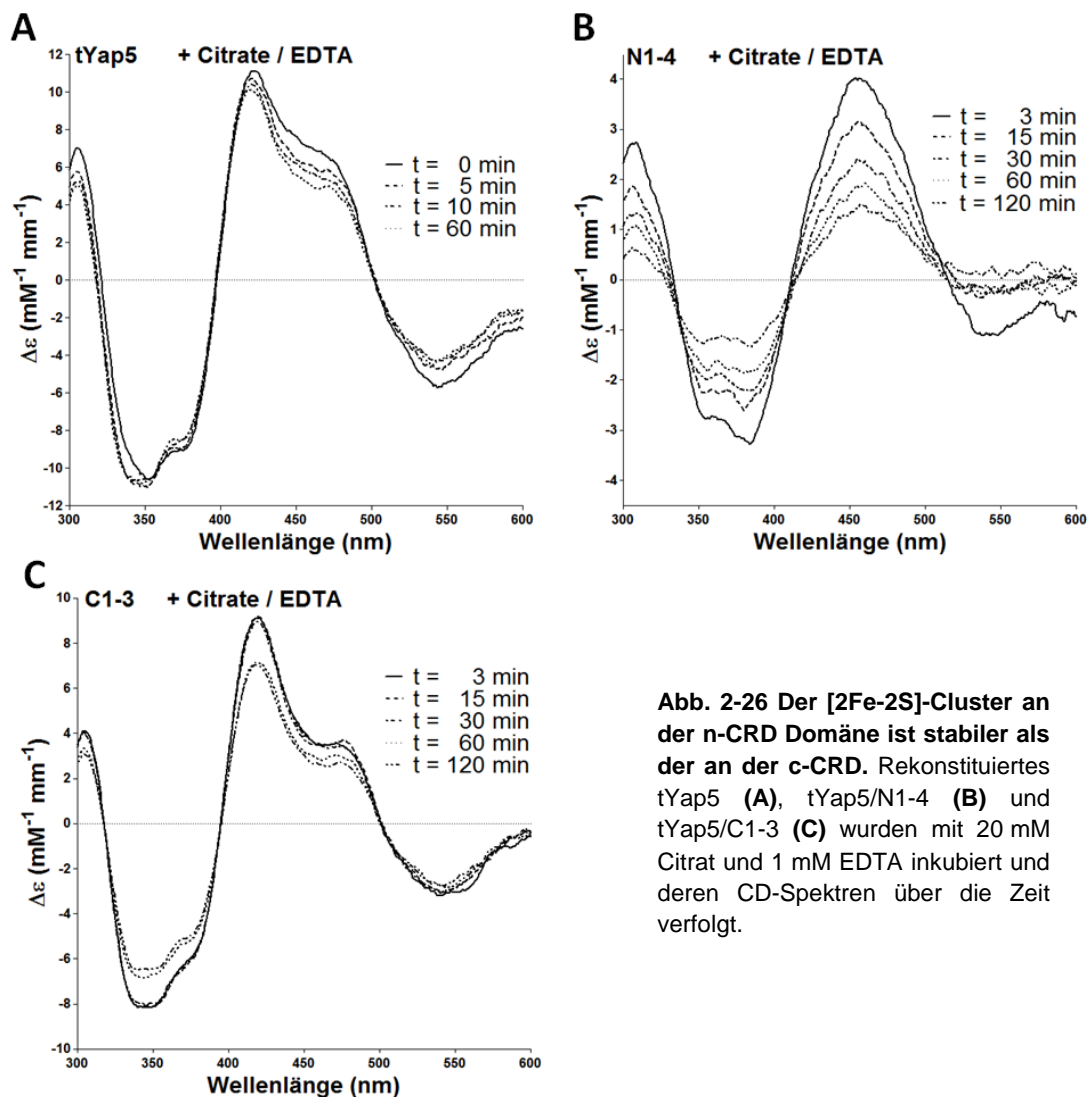


**Abb. 2-25 Die Fe/S-Cluster sind stabil gegenüber Behandlung mit GSH aber instabil in Gegenwart von BPS. (A)** Über die Zeit aufgenommenes CD-Spektrum des rekonstituierten tYap5 nach Behandlung mit 5 mM GSH oder **(B)** 50  $\mu$ M BPS als Eisenchelator.

Holo-tYap5 zeigte sich jedoch gegen die Behandlung mit Glutathion resistent. Selbst nach 16 h in Gegenwart von 5 mM GSH zeigte sich kaum eine Veränderung des CD-Spektrums. Dagegen reduzierte sich die Intensität des Spektrums in Gegenwart des Eisenchelators BPS bereits nach 5 min auf 60 % und nach 120 min auf 32 % bezogen

auf das Maximum bei 422 nm zum Zeitpunkt 0. Dies impliziert eine mögliche Deaktivierung von Yap5 *in vivo* durch die Extraktion von Eisen aus dem als Sensor fungierenden Fe/S-Cluster.

Überdies zeigte sich eine hohe Sensitivität des Fe/S-Clusters der c-CRD gegen die Anwesenheit von Citrat und EDTA. Nach 60 min war die Intensität des CD-Spektrums von tYap5/N1-4 auf 40 % verringert. Dagegen war das CD-Spektrum von tYap5/C1-3 nach 2 h noch auf 80 % seiner anfänglichen Intensität (Abb. 2-26 B und C).



**Abb. 2-26** Der [2Fe-2S]-Cluster an der n-CRD Domäne ist stabiler als der an der c-CRD. Rekonstituiertes tYap5 (A), tYap5/N1-4 (B) und tYap5/C1-3 (C) wurden mit 20 mM Citrat und 1 mM EDTA inkubiert und deren CD-Spektren über die Zeit verfolgt.

Offensichtlich ist der Fe/S-Cluster an der n-CRD stabiler gegen die Extraktion von Eisen als der an der c-CRD. Die Behandlung mit diesen Chelatoren reduzierte ebenfalls das CD-Spektrum von Wildtyp tYap5 leicht. Allerdings betraf dies mehr das Plateau bei

450 nm – 475 nm, zu dem vor allem das CD des C-terminalen Cofaktors beiträgt, als das Maximum bei 422 nm, das auf den N-terminalen Fe/S-Cluster zurückgeht. Dies deutet daraufhin, dass auch im Wildtyp tYap5 der in der n-CRD koordinierte Fe/S-Cluster stabiler als der Cluster am C-Terminus ist. Somit hat Citrat und EDTA keinen Einfluss auf den sensorischen Fe/S-Cluster von Yap5. Eine mögliche Relevanz dieser Beobachtung *in vivo* bleibt zunächst unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.



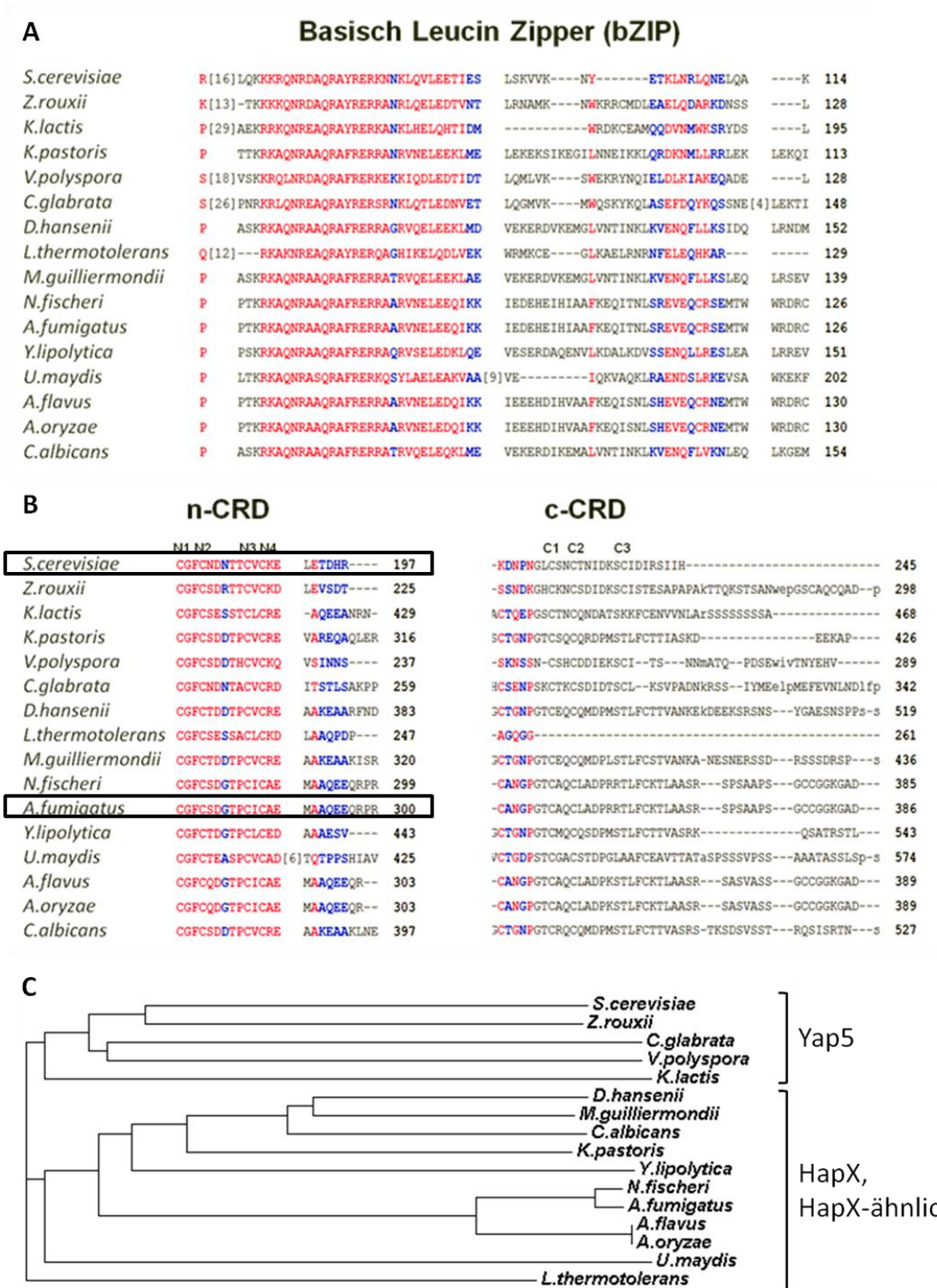
## 2.3 Der Transkriptionsfaktor HapX ist ein Fe/S-Protein

Die Eisenversorgung ist ein wichtiger Virulenzfaktor für opportunistische Krankheitserreger wie z.B. dem Pilz *Aspergillus fumigatus* (Schrettl & Haas 2011). In diesem Zusammenhang konnte der bZIP-Transkriptionsfaktor HapX als einer der beiden Hauptregulatoren der Adaptation an Eisenmangel identifiziert werden. Demzufolge stellt HapX durch Repression des Eisenverbrauchs und gleichzeitiger Aktivierung der Siderophor-vermittelten Eisenaufnahme einen essentiellen Virulenzfaktor von *A. fumigatus* und anderer Pilze dar (Schrettl *et al.* 2010). Auch wenn die Funktion des weitverbreiteten Transkriptionsfaktors HapX eine andere ist als die von Yap5 der Bäckerhefe, so besitzen beide, nicht nur bezogen auf die bZIP DNA-Bindedomäne, Ähnlichkeiten in den Proteinsequenzen (Abb. 2-27). HapX besitzt, wie Yap5, konservierte Cystein-reiche-Domänen, wobei insbesondere die n-CRD Domäne von HapX das gleiche CGFC-Motiv wie die n-CRD von Yap5 besitzt. Auch die anderen beiden Cysteine der n-CRD von Yap5 sind in HapX konserviert und befinden sich im gleichen Abstand zum CGFC Motiv. Mit Hinblick auf die Daten von Yap5 legt dies die Bindung eines funktionellen Fe/S-Clusters an HapX nahe (Abb. 2-28 A).

### 2.3.1 tHapX assembliert einen ISC- und CIA-abhängigen Fe/S-Cluster

Der etablierte  $^{55}\text{Fe}$ -Bindungs-Assay in *S. cerevisiae* lässt sich nicht ohne weiteres auf *Aspergillus* übertragen. Daher wurde die codierende Sequenz der vermuteten Aktivator-domäne von HapX C-terminal mit einem Myc-tag fusioniert und in einen 2 $\mu$ -Vektor für die Expression in *S. cerevisiae* unter der Kontrolle des *TDH3* Promotors kloniert. Wie bei tYap5 wurde tHapX in W303 Wildtyp Zellen und in depletierbare Gal-Stämme der ISC- und CIA-Maschinerie transformiert.

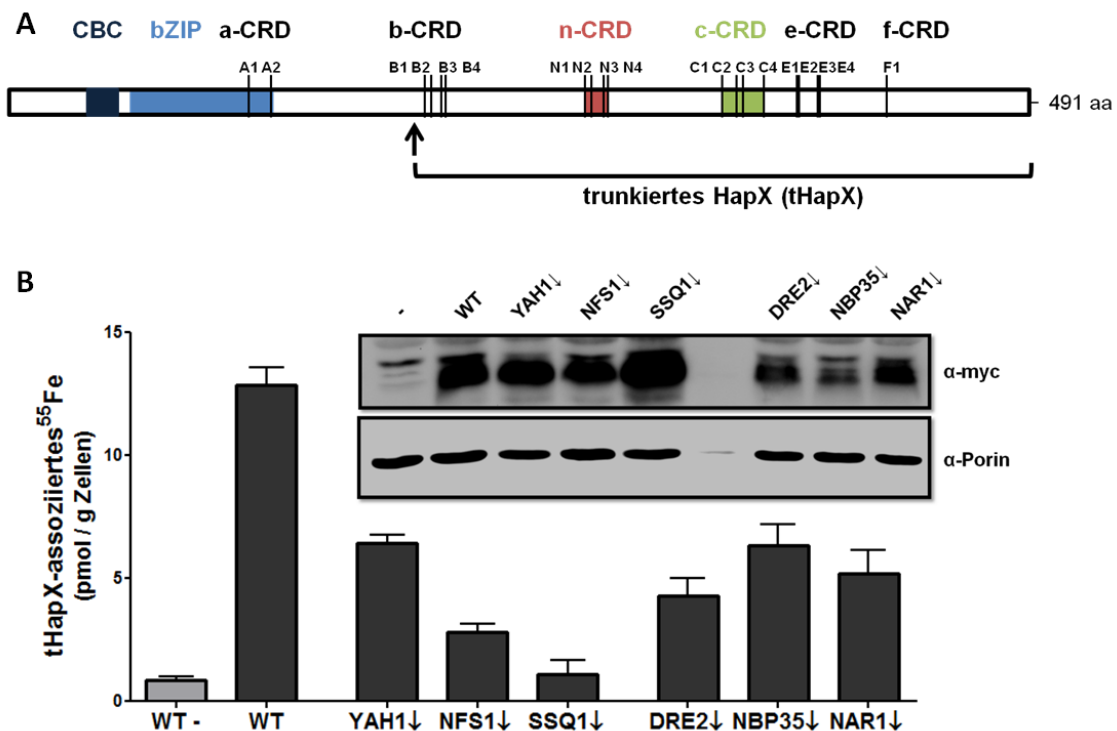
Nach dem Wachstum auf eisenarmem Medium wurden die Zellen für 2 h radioaktiv markiert. Während in Zellen ohne tHapX nur ein geringes Hintergrundsignal mit Myc Antikörpern co-immunpräzipitiert wurde, konnte in Zellen, die die verkürzte Version von HapX exprimierten, 13 pmol  $^{55}\text{Fe}$  / g Zelle immunpräzipitiert werden. In der Hefe exprimiertes tHapX bindet daher Eisen und / oder Fe/S-Cofaktoren.



**Abb. 2-27** Das CGFCX<sub>5</sub>CXC-Motiv in der n-CRD ist in Yap5 und HapX Transkriptionsfaktoren konserviert. **(A)** Sequenzvergleich des basischen Leucin-Zipper Motivs zwischen Yap5 und HapX verschiedener Pilze. **(B)** Sequenzvergleich der n-CRD und c-CRD Domänen von Yap5 und HapX. **(C)** Phylogenetischer Stammbaum der Pilzspezies, die Yap5 oder HapX exprimieren. Sequenzvergleiche und Stammbäume wurden mit Hilfe des *Constraint-based Multiple Alignment Tool* (COBALT) sowie CLUSTAL OMEGA (1.2.0) Programms in Bezug zu *S. cerevisiae* Yap5 erstellt.

Die Depletion der Komponenten der ISC-Assemblierungskomponenten Yah1, Ssq1 oder Nfs1 in den entsprechenden Gal-Stämmen führte zum Rückgang der  $^{55}\text{Fe}$ -Bindung an tHapX auf 6,4 in Gal-YAH1, 2,8 in Gal-NFS1 und 1,1 pmol/g in Gal-SSQ1. Dies ist ein erstes Indiz für die Bindung eines Fe/S-Clusters an HapX (Abb. 2-28 B).

Im auffälligen Gegensatz zu tYap5 zeigte die Eisenbindung an tHapX eine CIA-Abhängigkeit. Die Depletion von *DRE2* ließ die  $^{55}\text{Fe}$ -Inkorporation auf 33 % sinken und in Gal-NBP35 sowie -NAR1 auf 50 % bzw. 40 % im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 2-28 B). Die Proteinmengen tHapX zeigten allerdings sehr unterschiedliche Expressionsniveaus in den einzelnen Stämmen. Nichtsdestotrotz war in allen Gal-ISC/CIA-Stämmen stets HapX nachweisbar. Die Abhängigkeit der Eisenbindung an HapX von der mitochondrialen ISC- und der cytosolischen CIA-Maschinerie belegen, dass tHapX einen Fe/S-Cofaktor bindet.



**Abb. 2-28 tHapX bindet einen ISC- und CIA-abhängigen Fe/S-Cluster. (A)** Schematische Darstellung der Proteinsequenz von HapX. Der Pfeil zeigt den in dieser Studie verwendeten Start der verkürzten HapX Version (tHapX) an. (CBC: CCAAT-binding complex; bZIP: basischer Leucin-Zipper; CRD: Cystein-reiche Domäne) **(B)** W303 Zellen und die angegebenen Gal-ISC und -CIA Stämme wurde mit einem tHapX-myc kodierenden Plasmid transformiert, 16 h in eisenarmen Medium angezogen und für 2 h radioaktiv mit  $^{55}\text{Fe}$  markiert. Nach dem Zellaufschluss wurde HapX mit Myc-spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert und co-immunpräzipitiertes  $^{55}\text{Fe}$  per Szintillationszählung quantifiziert. Western Blot Analysen zur Kontrolle des Proteinlevels wurden mittels des Gesamtzell-extrakts durchgeführt. Zum Nachweis von HapX wurde ein spezifischer Myc Antikörper verwendet. Porin diente als Ladekontrolle (s. Einschub). Fehlerbalken geben den SEM an (n > 3).

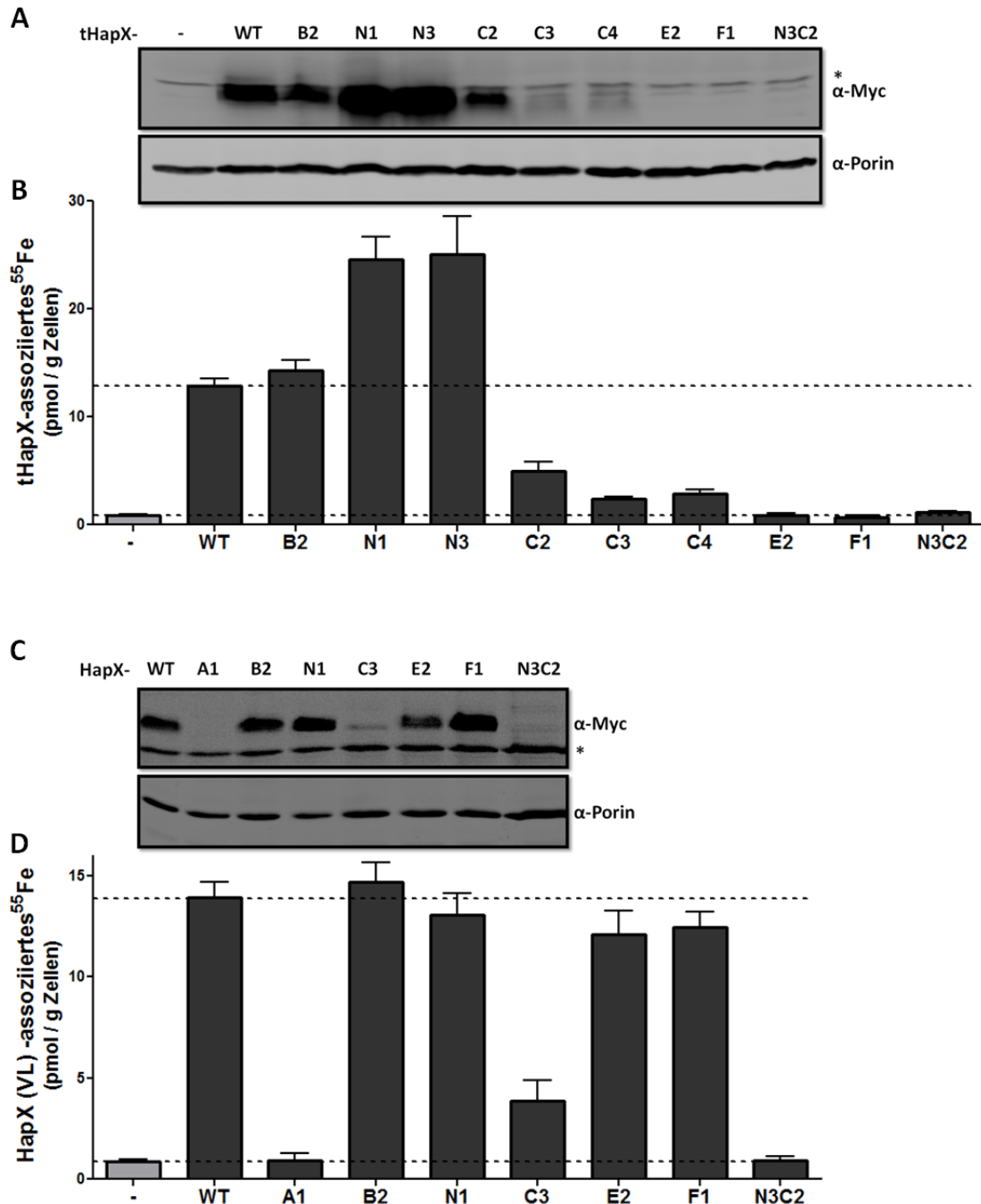
### 2.3.2 Die c-CRD des HapX ist an der Koordination eines Fe/S-Cofaktors beteiligt

Im nächsten Schritt wurde versucht den Ort der Fe/S-Clusterbindung genauer einzugrenzen. Hierzu wurde die *in vivo*  $^{55}\text{Fe}$ -Bindung von tHapX Varianten mit Mutationen in Cysteinresten der einzelnen CRDs getestet (s. Abb. 2-28). Die Vektoren mit den einzelnen Mutationen wurden von Dr. Fabio Gsaller (AG Haas, Innsbruck) zur Verfügung gestellt und für die Expression in *S. cerevisiae* in einen Hefe-spezifischen Vektor kloniert. Die Cystein zu Alanin Substitution im Cysteinrest B2 verursachte keine wesentlichen Veränderungen in der  $^{55}\text{Fe}$ -Bindung an tHapX, wohingegen die Mutation in N1 und N3 sogar zur Erhöhung um das ca. 2-fache führte, was mit einem deutlich erhöhten Proteinlevel einherging. Mutationen in der c-CRD führten zum Verlust der  $^{55}\text{Fe}$ -Bindung, lagen aber noch leicht über dem Hintergrundwert von Zellen mit dem Leervektor. Allerdings waren die Expressionslevel der verwendeten Mutanten C3 und C4 ebenfalls sehr stark erniedrigt, so dass sich mit diesen Mutanten keine eindeutige Aussage über die Rolle der mutierten Cysteine hinsichtlich einer Eisenbindung an tHapX treffen lässt. Das gleiche Bild zeigte sich für die tHapX Varianten E2, F1 und der Doppelmutation N3C2. Lediglich bei der tHapX Variante C2 kam es zu einer Verringerung der Eisenbindung ohne Beeinträchtigung des Proteinlevels, so dass es sich bei C2 um einen Fe/S-Clusterliganden handeln könnte (Abb. 2-29 A und B).

Nichtsdestotrotz ist dieses Resultat kritisch zu betrachten, da die Proteinmengen von tHapX stark schwankten. Zum einem könnten die Mutationen der Cysteine direkt oder die fehlende Koordination eines Fe/S-Cofaktors indirekt zur Destabilisierung des Proteins führen.

In einem weiteren Ansatz zur Aufklärung der Cluster-kordinierenden Cysteine wurde das Volllängen HapX (HapX-VL) untersucht. Dies wurde ebenfalls mit einem C-terminalen Myc-tag in einem 2 $\mu$ -Vektor unter der Kontrolle des *TDH3* Promotors exprimiert. Bei HapX-VL war eine Bindung von  $^{55}\text{Fe}$  in W303-1A Wildtypzellen (13,9 pmol/g) messbar (Abb. 2-29 C und D). Die Cystein zu Alanin Substitutionen in den Cystein-Resten B2, N1 sowie E2 und F1 zeigten keine wesentlichen Veränderungen der  $^{55}\text{Fe}$ -Bindung relativ zum Wildtyp-Protein. Ähnlich zu tHapX-C3 zeigte sich im HapX-VL mit C3 Mutation ein Verlust der Eisenbindung um 70 % und ein stark vermindertes Proteinlevel. Die Mutanten A1 und N3C2 dagegen lagen auf dem gleichen Niveau wie mit Leervektor transformierte Zellen und im Western Blot ließ sich kein Protein nachweisen. Ebenfalls war das Proteinlevel von HapX-C3 im Vergleich zum WT ver-

ringert, jedoch noch nachweisbar. Die Proteinmengen von B2, N1, E2 sowie F1 war hingegen mit denen des Wildtyp-Proteins vergleichbar (Abb. 2-29 C und D).



**Abb. 2-29 Mutationen der c-CRD in tHapX und HapX-VL deuten auf eine Cluster-koordinierende Funktion hin.** (A, C)  $^{55}\text{Fe}$ -Bindung an tHapX bzw. im Vollängen HapX und in den angegebenen Cysteinmutanten wurde in *S. cerevisiae* W303-1A bestimmt. Fehlerbalken geben den SEM an ( $n < 3$ ). (B, D) Die Proteinlevels der Cystein Mutationen in tHapX bzw. HapX-VL wurden in Western Blots mit einem spezifischen Myc Antikörper überprüft. Porin und die unspezifische Bande (\*) dienten als Ladekontrolle.

Zusammenfassend zeigten sich Parallelen aber auch Unterschiede zwischen den Transkriptionsfaktoren Yap5 und HapX. Während der [2Fe-2S]-Cluster von Yap5 ausschließlich ISC-abhängig ist, benötigt in *S. cerevisiae* exprimiertes HapX sowohl die ISC- als auch die CIA-Maschinerie zur Cluster-Bindung. Yap5 koordiniert *in vivo* einen sensorischen Fe/S-Cluster in der n-CRD, dagegen deutet sich die Koordination in HapX am wahrscheinlichsten in der c-CRD an. Die Funktion und Regulation von HapX wird von Gsaller *et al.* (Publikation in Vorbereitung) sowie z.T. in der Diskussion dieser Arbeit näher erläutert.

### 3 Diskussion

#### 3.1 Die Rolle des Pyrimidin-Transporters Rim2 in der mitochondrialen Eisenversorgung

Mitochondrien sind für den Eisenmetabolismus der gesamten eukaryotischen Zelle von der Hefe bis zum Menschen essentiell. Zum einen sind die Fe/S-Cluster (ISC) Assemblierungs- und Export-Maschinerien der Mitochondrien wichtig für die Maturierung mitochondrialer, cytosolischer und nukleärer Fe/S-Proteine (Atkinson & Winge 2009, Richardson *et al.* 2010, Lill *et al.* 2012). Zum anderen spielen sie eine Rolle in der Synthese des Häm-Cofaktors, dessen letzter Schritt ebenfalls in den Mitochondrien katalysiert wird (Hamza & Dailey 2012). Somit wird der Großteil des zellulären Eisens in diesem Organell der Zelle umgesetzt. In mehreren Studien wurden die mitochondrialen Carrier Mrs3 und Mrs4 (in Vertebraten Mitoferrin1 und Mitoferrin2) als Eisentransporter charakterisiert (Foury & Roganti 2002, Muhlenhoff *et al.* 2003b, Shaw *et al.* 2006, Paradkar *et al.* 2009). Die Deletion beider Carrier verursacht allerdings keinen letalen Phänotyp in *S. cerevisiae*. Folglich müssen weitere mitochondriale Eisenaufnahmesysteme existieren.

Der mitochondriale Carrier Rim2 wurde zunächst in einem genetischen Screen als *multi-copy suppressor* von Zellen isoliert, in denen der mitochondriale Magnesium-Importer Mrs2 deletiert worden war (Van Dyck *et al.* 1995). Anschließend konnte nachgewiesen werden, dass Rim2 ein mitochondrialer Pyrimidintransporter ist (Marobbio *et al.* 2006). Ein Hinweis für eine Funktion im Eisentransport zeigte sich in einem weiteren synthetisch-letalen Screen für Zellen mit Defekten im Eisenmetabolismus (Lin *et al.* 2011). Die mögliche zusätzliche Funktion von Rim2 warf daher die Frage auf, wie ein nachgewiesener Pyrimidin-Transporter eine Rolle bei der mitochondrialen Eisenaufnahme spielen kann.

Eine zeitlich parallel zu dieser Arbeit publizierte Studie legt eine vom Pyrimidin-Transport unabhängige, spezifische Funktion von Rim2 in der Eisenaufnahme der Mitochondrien nahe (Yoon *et al.* 2011). Die Autoren postulieren des Weiteren eine Hauptfunktion als (Pyrimidin-unabhängigen) Eisen-Transporter und eine sekundäre Funktion von Rim2 im Pyrimidin-Transport. Im Gegensatz hierzu zeigte, die erste Studie von 2006, dass Rim2 ein Pyrimidin-Nukleotid-Transporter ist (Marobbio *et al.* 2006). In die-

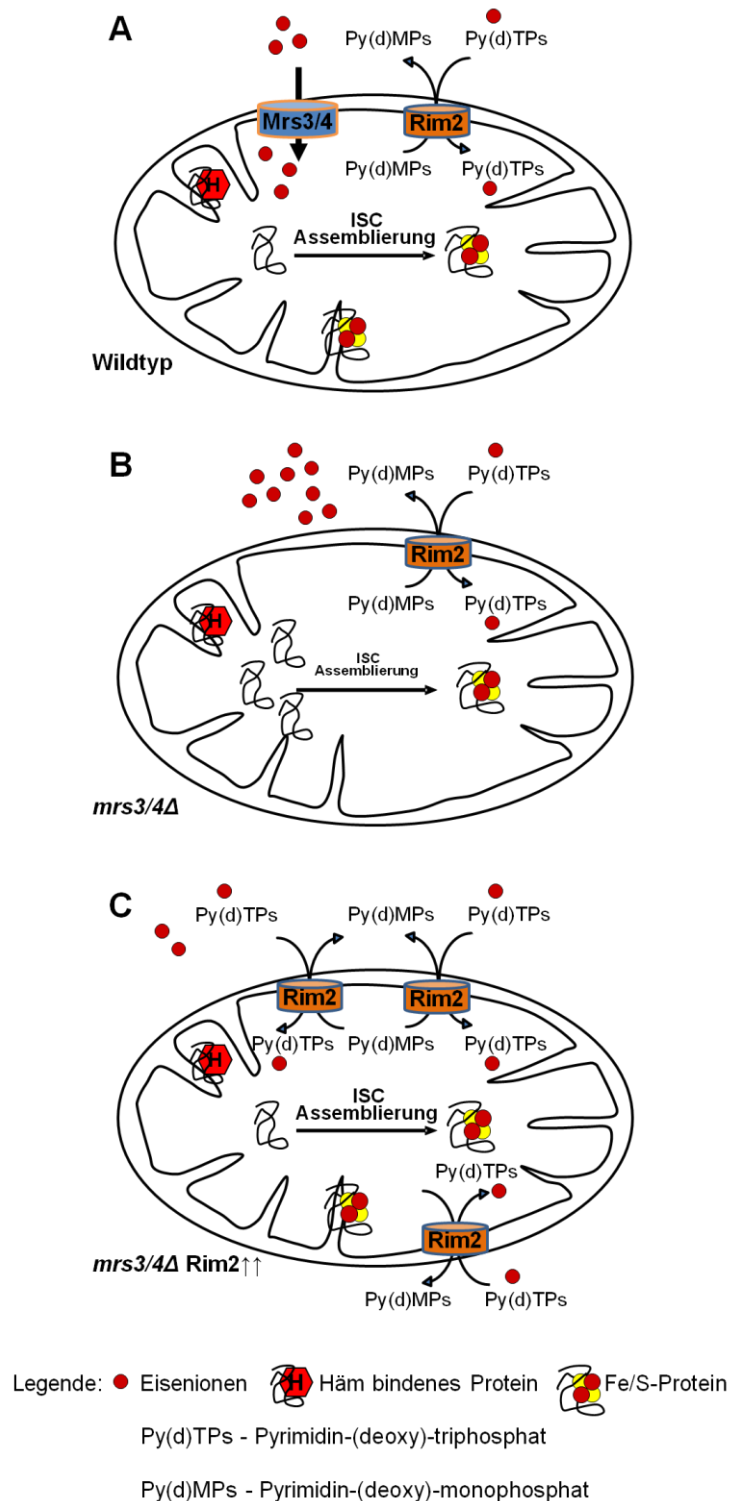
ser Studie wurde Rim2 rekombinant aus *E. coli* aufgereinigt, in Phospholipidvesikeln rekonstituiert und auf seine Transporteigenschaften hinsichtlich verschiedener Substrate getestet. Als Hauptsubstrat wurden Pyrimidin-(deoxy)-Di und -Triphosphate identifiziert. Diese werden im Austausch gegen Pyrimidin-(deoxy)-mono-Phosphate transportiert. Pyrimidine werden nicht nur zur Synthese der mitochondrialen DNA (mtDNA), sondern auch für mRNA, tRNA, rRNA sowie RNA-Primer in den Mitochondrien benötigt. Die Synthese der Pyrimidin-Nukleotiden findet jedoch außerhalb der mitochondrialen Matrix statt (Amutha & Pain 2003, Yao *et al.* 2003). Der Verlust der mtDNA bei Deletion von *RIM2* unterstützt die physiologische Rolle als Pyrimidin-Importer. Eine potenzielle Metall-Abhängigkeit als Nukleotidtransporter wurde in dem Liposom-basierten Transport-Assay nicht untersucht.

Aufgrund dieser Widersprüche wurde Rim2 erneut mit einer weiteren *in vitro* Methode analysiert, die bereits für die Charakterisierung von Mrs3 und Mrs4 entwickelt wurde und die auf den Eisenimport fokussiert war (Froschauer *et al.* 2009). Hierfür wurden sog. submitochondriale Partikel (SMPs) aus Mitochondrien von *mrs3/4Δ* Zellen mit *RIM2* Überexpression generiert. SMPs sind Vesikel aus der mitochondrialen Innenmembran. Zum Test des Eisentransports wurden die SMPs mit dem fluoreszierenden, divalenten Metall Chelator PGSK (*Phen Green SK*) beladen. Dessen Fluoreszenz wird bei Metallbindung gelöscht, was nach dem Import von Metallionen in das Innere der SMPs erfolgt. Die alleinige Zugabe von  $\text{Fe}^{2+}$  führte jedoch zu keiner Auslöschung der Fluoreszenz und somit nicht zum Rim2-vermittelten Eisentransport. Wurde allerdings ein Pyrimidintriphosphat zusammen mit  $\text{Fe}^{2+}$  verwendet, so kam es zur Auslöschung der Fluoreszenz. Dabei war entscheidend, dass  $\text{Fe}^{2+}$  zusammen mit dem Pyrimidin von außen zu den SMPs gegeben wurde. Diese Daten legen nahe, dass Rim2 einen direkt vermittelten Co-Import von Eisenionen mit Pyrimidinnukleotiden über die mitochondriale Innenmembran katalysiert. Dieser Co-Import von Eisen war konzentrationsabhängig und spezifisch für Pyrimidine, da  $\text{Fe}^{2+}$  nicht zusammen mit Purinen importiert wurde. In Übereinstimmung mit der Theorie eines Co-Imports von Pyrimidinen mit Eisenionen zeigte sich, dass Rim2-Varianten mit Mutationen in der Substratbindungsstelle, der sog. *contact site II* (*rim2-1*) (s. Abb. 1-4), sowohl im Pyrimidin- als auch im  $\text{Fe}^{2+}$ -Transport gestört waren (Froschauer *et al.* 2013). Ein Co-Transport von Substraten zusammen mit Kationen ist nichts Ungewöhnliches in der mitochondrialen Carrier-Familie. Mehrere Vertreter der mitochondrialen Carrier Familie, wie z.B. der Oxodicarboxylat oder der GDP/GTP-Carrier sind als Proton-Substrat Co-Transporter beschrieben worden (Kunji & Robinson 2010). Ein Co-Import von divalenten Metallionen im Komplex mit Pyrimidinnukleotiden erklärt ebenfalls den supprimierenden Effekt



der Überexpression von *RIM2* in *mrs3/4Δ* Zellen. Daher ist Rim2 in der Lage sowohl den  $Mg^{2+}$ -Transport in *mrs2Δ* Zellen als auch den  $Fe^{2+}$ -Transport in *mrs3/4Δ* Zellen zu gewährleisten (Van Dyck *et al.* 1995, Lin *et al.* 2011). *In vitro* transportierte Rim2 in SMPs unterschiedliche divalente Metallionen mit einer Präferenz für  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  und  $Zn^{2+}$ . Unter physiologischen Bedingungen ist ein Co-Import der Pyrimidine mit  $Mg^{2+}$  am wahrscheinlichsten, da es in viel höheren Konzentrationen vorkommt als die Spurenelemente wie z.B. Eisen. In Zellen, in denen *MRS3* und *MRS4* deletiert wurde, kommt es allerdings zur erhöhten Aufnahme von Eisen im Cytosol (Foury & Roganti 2002). Eine erhöhte cytosolische Eisenmenge könnte wiederum zum signifikanten Co-Import von Eisen mit Pyrimidinen über Rim2 führen und somit die Mitochondrien auch in Abwesenheit von Mrs3 und Mrs4 mit Eisen versorgen und damit einen letalen Phänotyp verhindern (Abb. 3-1).

Des Weiteren liefert der Co-Import von  $Fe^{2+}$  mit Pyrimidinen eine plausible Erklärung für die Rettung der Defekte von *mrs3/4Δ* Zellen in der Fe/S-Cluster Maturierung und der Häm-Synthese bei Überexpression von *RIM2*. Dagegen zeigte eine nur geringe Expression mittels des natürlichen Promotors keine signifikante Verbesserung der Defekte weder in der *de novo*  $^{55}Fe$ -Assemblierung noch in den Enzymaktivitäten Eisen-abhängiger Proteine. Unter physiologischen Bedingungen, bei normaler *RIM2*-Expression ist daher keine wesentliche Funktion des Rim2 in der mitochondrialen Eisenhomöostase ersichtlich. Es gibt keinen Hinweis darauf, dass Rim2 in *S. cerevisiae* stark überexprimiert wird. Unter keinen der je getesteten Bedingungen war Rim2 hoch reguliert (stets unterhalb einer 2-fachen Induktion; s. <http://www.yeastgenome.org>). Rim2 zeigt weiterhin keine Eisen-abhängige Regulation, wie sie bei Mrs4 vorliegt (Rutherford *et al.* 2001). Somit liegt kein Indiz für eine Induktion von Rim2 zur Erhöhung der Eisenaufnahme in die Mitochondrien in *S. cerevisiae* vor. Die positiven Effekte von Rim2 bis hin zur Wiederherstellung der Eisenhomöostase auf Wildtypniveau in *mrs3/4Δ* Zellen wurden nur bei der Plasmid-basierten Überexpression erreicht (Abb. 3-1).



**Abb. 3-1 Die Rolle des Pyrimidintransporters Rim2 in der Eisenhomöostase.** Schematische, vereinfachte Zusammenfassung der Eisenhomöostase der Mitochondrien in **(A)** Wildtyp, **(B)** *mrs3/4Δ* und **(C)** *mrs3/4Δ Rim2↑↑* Zellen. **(A)** Unter physiologischen Bedingungen stellen die Carrier Mrs3 und Mrs4 die Haupteisentransporter dar. **(B)** Die Deletion von *MRS3/4* führt zur eingeschränkten Eisenaufnahme in die Mitochondrien und somit zur geringeren Aktivität der Fe/S-Cluster Assemblierungs-Maschinerie und der Häm-Synthese. Dies wiederum aktiviert das Aft1/2-induzierte Eisenregulon wodurch die zelluläre Eisenaufnahme und somit die Eisenkonzentration im Cytosol erhöht wird. **(C)** Die Überexpression von *RIM2* sorgt für eine ausreichende Eisenaufnahme in die Mitochondrien über einen Co-Import des Eisens mit Pyrimidinen. Die Darstellung des Pyrimidin-Metabolismus ist angelegt an eine Veröffentlichung von Palmieri *et al.* 2006.

Die Schlussfolgerungen aus den Daten des *in vitro* SMP-basierten Assays und der Analyse *in vivo* stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen von Dancis und Kollegen (2011) über eine separate Funktion von Rim2 im Pyrimidin- und Eisentransport. Diese zentrale Erkenntnis ihrer Arbeit beruhte auf der Beobachtung eines Häm-Synthesedefekts, aber nicht Pyrimidintransportdefekts in isolierten Mitochondrien aus Rim2-depletierten (Gal-RIM2) Zellen bei geringer Salzkonzentration. Allerdings könnte diese unphysiologische Salzkonzentration zur teilweisen Öffnung der Mitochondrien führen und somit zum unspezifischen Eisentransport bzw. Pyrimidinimport. Im Gegensatz hierzu, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *rim2Δ* Zellen keinen wesentlichen Effekt auf die *de novo* Häm-Synthese im Vergleich zu Wildtyp *rho<sup>0</sup>* Zellen hat. Entscheidend war dabei die Nutzung von isogenen *rho<sup>0</sup>* Stämmen und nicht dem *rho<sup>+</sup>* Wildtypstamm. Bereits die bei Yoon *et al.* (2011) verwendete Depletion von Rim2 über einen Galactose-regulierten Promotor führt zum Verlust der mtDNA. Dies wiederum hat drastische Veränderungen im mitochondrialen Metabolismus und der Genexpression zur Folge (Liu & Butow 2006). Insbesondere der akute Verlust der mtDNA führt zu massiven, transienten Veränderungen in der zellulären Eisenhomöostase durch eine sog. „Krise“ (Veatch *et al.* 2009). Wahrscheinlich verursachte dieser Übergang von einer mtDNA-haltigen Zelle zu einer mtDNA-freien Zelle eine Stresssituation mit einem Häm-Synthesedefekt. Dies könnte zwanglos auch die Daten von Yoon *et al.* (2011) erklären. Die Verwendung eines *rho<sup>+</sup>*-Stamms macht die Interpretation einer potenziellen Eisentransportfunktion, unabhängig von der Rolle von Rim2 im mitochondrialen DNA-Metabolismus, schwierig. Zur Vermeidung dieser sekundären Effekte wurden in dieser Arbeit deshalb ausschließlich *rho<sup>0</sup>*-Stämme und zwei verschiedene Wildtypstämme verwendet. Sowohl im W303 als auch im BY4742 Stamm zeigten sich stets ähnliche Ergebnisse. Die Defekte der *de novo* Häm-Synthese in *mrs3/4Δ rim2Δ* Zellen zeigten sogar eine leichte Verbesserung verglichen mit den Defekten in *mrs3/4Δ rho<sup>0</sup>* Zellen. Dies war ein weiterer Beleg gegen eine spezifische und separate Funktion von Rim2 bei der Synthese von Häm.

Die zusätzliche Deletion von *RIM2* in *mrs3/4Δ* Zellen führte zu einer weiteren Verringerung der Syntheseeffizienz von Fe/S-Proteinen, wie z.B. Aconitase, Leu1 oder Bio2. Allerdings zeigte sich kaum eine Verschlechterung zwischen WT *rho<sup>0</sup>* und *rim2Δ* Zellen. Rim2 spielt daher keine signifikante Rolle im Eisenmetabolismus unter physiologischen Bedingungen. Dies zeigt auch der Vergleich von *mrs4Δ/rim2Δ* mit *mrs3/4Δ rho<sup>0</sup>* Zellen. Aufgrund der Anwesenheit von Mrs3 prägen *mrs4Δ/rim2Δ* Zellen keinen starken Phänotyp aus, weder in der Fe/S-Cluster- noch in der Häm-Synthese. In Anwesenheit von Mrs3 und Mrs4 trägt Rim2 daher nur minimal zur mitochondrialen Eisen-

aufnahme bei. Des Weiteren ist die *mrs3/4Δ rim2Δ* Zelle lebensfähig. Dies bedeutet, dass noch weitere mitochondriale Transporter existieren müssen, die in Abwesenheit von Mrs3, Mrs4 und von Rim2 mit geringer Affinität Eisen in die Mitochondrien einschleusen können.

Zusammengefasst legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass Rim2 als mitochondrialer Carrier für den Co-Transport von Pyrimidinen und divalenten Metallionen inklusive  $\text{Fe}^{2+}$  fungiert. Diese Modelvorstellung erklärt, wie die mitochondriale Eisenaufnahme in *mrs3/4Δ* Zellen gesichert werden kann. Sowohl die *in vivo* als auch die *in vitro* Experimente zeigen, wie Rim2 als „*high copy suppressor*“ von *mrs3/4Δ* Zellen fungiert. Eine Funktion des Rim2 in der mitochondrialen Eisenhomöostase unter normalen physiologischen Bedingungen, d.h. in Anwesenheit von Mrs3 und Mrs4, ist jedoch eher unwahrscheinlich.

### 3.2 Die Rolle des Transkriptionsfaktors Yap5 in der Eisenhomöostase

Bei einem Eisenüberschuss aktiviert der *S. cerevisiae* Transkriptionsfaktor Yap5 die Expression von *CCC1*, der einen divalenten Metallimporter der Vakuole kodiert. Dies wiederum führt zur Sequestrierung von Eisen in die Vakuole, wodurch eine toxische Eisenakkumulation im Cytosol vermieden wird (Li *et al.* 2008). Wie Yap5 den Eisenstatus der Zelle erfasst, ist allerdings unklar. In Bakterien fungieren Fe/S-Cofaktoren in einer Vielzahl von regulatorischen Proteinen als Sensoren für verschiedenste Moleküle, wie molekularen Sauerstoff, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sowie Schwermetallionen (Crack *et al.* 2012a, Crack *et al.* 2012b). Fe/S-Cluster können sensibel auf diese umweltbedingten Einflüsse reagieren. Dies kann zur Änderung des Clustertyps, z.B. vom [4Fe-4S]- zum [2Fe-2S]-Cluster, oder gar zu dessen Zerstörung führen. Aufgrund des Einflusses der Fe/S-Cluster auf die Proteinkonformation eignen sie sich daher besonders gut als Sensoren von Transkriptionsfaktoren (Crack *et al.* 2012a, Crack *et al.* 2012b). In Eukaryoten hingegen sind bisher keine Transkriptionsfaktoren mit einem sensorischen Fe/S-Cluster bekannt. Als einziges Beispiel eines regulatorischen Fe/S-Cofaktors wurde das *iron-regulatory protein* IRP1 charakterisiert. IRP1 reguliert über die Bindung an *iron-responsive elements* posttranskriptionell die Stabilität von mRNAs von Genen, die in der zellulären Eisenaufnahme und Speicherung involviert sind (Hentze *et al.* 2010). In dieser Arbeit konnte erstmals die Bindung eines Fe/S-Clusters als funktioneller Sensor am bZIP-Transkriptionsfaktor Yap5 von *S. cerevisiae* nachgewiesen werden.

Yap5 ist ein modularer Transkriptionsfaktor der AP-1 ähnlichen Yap-Familie und besteht aus einer N-terminalen bZIP DNA-Bindedomäne und einer C-terminalen Aktivator-domäne. Die Aktivator-domäne (tYap5) beinhaltet zwei Cystein-reiche Domänen (CRDs); die n-CRD und die c-CRD. Fusioniert man die Aktivator-domäne von Yap5 an eine DNA-Bindedomäne eines anderen Transkriptionsfaktors, wie z.B. Gal4, ist dieser artifizielle Transkriptionsfaktor unter Hocheisenbedingungen in der Lage, die Expression von Genen zu aktivieren (Li *et al.* 2008). Somit stellt tYap5 eine unabhängige aktivierende Einheit dar. Genetische Studien lieferten die ersten Indizien für eine Fe/S-Cluster Beteiligung an der Regulation von Yap5 (Li *et al.* 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde die direkte Assoziation von Eisen an tYap5 *in vivo* nachgewiesen. Dazu wurden die Zellen mit radioaktiven  $^{55}\text{Fe}$  markiert. Nach einer anschließenden Immunpräzipitation von tYap5 konnte die  $^{55}\text{Fe}$ -Bindung im Szintillations-

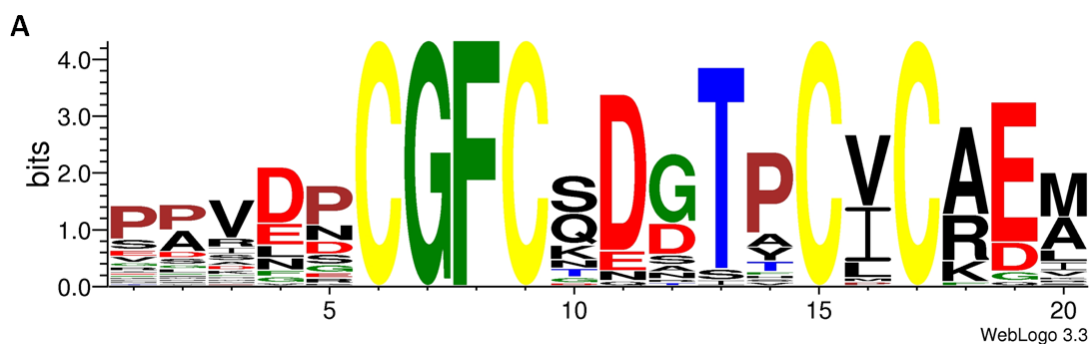
zähler quantifiziert werden. Da die Eisenbindung an tYap5 abhängig von der ISC-Maschinerie ist, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem gebundenen  $^{55}\text{Fe}$  um einen  $^{55}\text{Fe}/\text{S}$ -Cluster handelt.

Bei der Substitution der Cysteine der n-CRD zeigte sich eine graduelle Erniedrigung der Eisenbindung und eine parallele Verringerung der transkriptionellen Aktivität von Yap5. Jedoch führten die bisher charakterisierten einzelnen Cysteinsubstitutionen nicht zu einem hohen (> 50 %) Verlust der  $^{55}\text{Fe}$ -Bindung, daher können aus solchen Experimenten keine Rückschlüsse auf die koordinierenden Cysteine gemacht werden. Erst die gleichzeitige Substitution aller vier Cysteine in der n-CRD resultierte im vollständigen Verlust der Eisenbindung an tYap5 und zum Verlust der transkriptionellen Aktivierung von *CCC1*. Dies bedeutet, dass dem an der n-CRD gebundenen Fe/S-Cofaktor eine regulatorisch entscheidende Rolle für die Funktion von Yap5 zukommt. Dagegen zeigte sich bei Mutationen der Cysteine in der c-CRD kein Rückgang in der Eisenbindung *in vivo*, und selbst bei der Substitution aller C-terminalen Cysteine blieb die Eisenbindung an tYap5 nahezu unverändert. Ebenfalls führte dies zu keiner Verminderung der Aktivierung von *CCC1* unter Hocheisenbedingungen. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass Yap5 einen regulatorischen Fe/S-Cluster als Sensor in der n-CRD *in vivo* bindet.

Die in dieser Arbeit nachgewiesene ISC-abhängige, aber CIA-unabhängige Maturierung des Fe/S-Clusters von tYap5 ist untypisch für ein cytosolisches bzw. nukleäres Protein. Eine ähnliche CIA-Unabhängigkeit wurde bis jetzt nur beim cytosolischen Glutaredoxin Grx4 und beim CIA-Faktor Dre2 identifiziert. Dre2 bindet sowohl einen [2Fe-2S]- als auch [4Fe-4S]-Cluster (Zhang *et al.* 2008). Grx4 dagegen koordiniert als Dimer einen gebrückten [2Fe-2S]-Cluster mit zwei Glutathionliganden (Muhlenhoff *et al.* 2010). Dieser Fe/S-Cofaktor auf Grx4 ist essentiell für die Regulierung der Eisen-abhängigen Transkriptionsfaktoren Aft1 und Aft2. In *S. cerevisiae* führen Defekte in der Fe/S-Protein Maturierung zu einer ähnlichen ISC-, aber nicht CIA-abhängigen Deregulation von Aft1/2 (Hausmann *et al.* 2008), so wie sie auch bei der Yap5 vermittelten Expression von *CCC1* der Fall ist. Im Gegensatz zu Aft1/2 spielt Grx4 jedoch keine Rolle in der Regulation von Yap5, da Zellen mit verringerten Mengen der cytosolischen Glutaredoxine keine erniedrigte Eisenbindung an tYap5 zeigten und auch die *CCC1* Expression nicht verändert war. Zusammengefasst deuten die Resultate der *in vivo* Analyse auf einen [2Fe-2S]-Cluster als Sensor an der n-CRD der Aktivatorodomäne von Yap5 hin.

Diese Schlussfolgerung wird durch die Ergebnisse der spektroskopischen Analyse des rekombinanten tYap5 Proteins unterstützt. Nach chemischer Rekonstitution zeigte tYap5 in der ESR-Spektroskopie die beiden typischen Charakteristika eines [2Fe-2S]-Clusters, nämlich ein von der Temperatur und der Mikrowellenleistung unabhängiges Spektrum, das sich unter Verwendung seiner experimentellen  $g$ -Werte und der für [2Fe-2S]-Cluster typischen Form sehr gut simulieren ließ. Dieser [2Fe-2S]-Cofaktor ist an der n-CRD gebunden, da sich die UV/VIS- und ESR-Spektren des Wildtyp tYap5 und des tYap5/C1-3, in dem die Cysteine der c-CRD substituiert sind, stark ähneln. Der [2Fe-2S]-Cluster in der n-CRD von Yap5 bindet daher im Sequenzmotiv CGFCX<sub>5</sub>CVC.

Dieses Sequenzmotiv hat Homologien zu den Metallbindungsdomänen von Metallothioneinen. In Glutaredoxinen dient die CGFC-Sequenz als Fe/S-Cluster-koordinierendes Motiv (Rouhier *et al.* 2010). Aus dem Sequenzvergleich von Yap5 und HapX sowie HapX-ähnlichen Transkriptionsfaktoren verschiedener Pilzarten wird deutlich, dass nicht nur die bZIP DNA-Bindedomäne, sondern auch die n-CRD zwischen Yap5- und HapX-Vertretern konserviert sind, im Gegensatz zur c-CRD (s. Abb. 2-27). Aus der Sequenz der n-CRD lässt sich ebenfalls ein Sequenzlogo mit konservierten Aminosäureresten erstellen (Abb. 3-2). Es ist daher zu vermuten, dass das Motiv der n-CRD aus Yap5 auch in diesen Transkriptionsfaktoren als Bindungsstelle für einen Fe/S-Cluster-Sensor fungieren könnte, auch wenn in dieser Arbeit dieser Nachweis für HapX aus *A. fumigatus* nicht abschließend gelungen ist (siehe weiter unten).



**Abb. 3-2 Sequenzlogo der n-CRD Domäne.** Das Sequenzlogo wurde aus den Yap5- und HapX-ähnlichen Proteinen von 38 Pilzarten mit Hilfe des WebLogo3 Programms erstellt (Crooks *et al.* 2004). Deutlich erkennbar ist dabei das CGFCX<sub>5</sub>CXC-Motiv sowie das Vorhandensein weiterer häufig auftretender Aminosäurereste.

Die Analyse des rekombinanten tYap5 ergibt des Weiteren einen Beleg für die mögliche Bindung eines zweiten Fe/S-Clusters an die c-CRD. Die tYap5/N1-4 Variante, in

der alle vier Cysteine der n-CRD substituiert wurden, zeigte in den UV/VIS-, CD- und ESR-Spektren ebenfalls Charakteristika eines Fe/S-Proteins. Im Vergleich zum Wildtyp tYap5 war die Form der ESR- und CD-Spektren von tYap5/N1-4 jedoch sehr unterschiedlich. Auf den ersten Blick ließ dies zunächst nicht auf das Vorhandensein dieses Fe/S-Clusters im Wildtyp-Protein schließen, sondern könnte ein *in vitro* Artefakt der chemischen Rekonstitution der tYap5/N1-4 Mutante darstellen. Allerdings zeigte sich bei genauerer Betrachtung der CD-Spektren, dass das Spektrum des Wildtyp tYap5 aus den, im ~ 1:1 Verhältnis addierten Spektren der beiden Mutanten tYap5/N1-4 und tYap5/C1-3 zusammengesetzt ist. Die Tatsache, dass das ESR-Spektrum des Wildtyp tYap5 nicht aus den beiden Mutanten zusammengesetzt ist, lässt vermuten, dass beide Cluster auf dem Protein sehr nah beieinander liegen, so dass eine magnetische Kopplung zwischen beiden Clustern auftritt, die zur teilweisen Auslöschung des ESR-Spektrums der Cluster führt (9-15 Å) (Mathews *et al.* 1974). Komplizierter wird die Auswertung der ESR-Daten unter Einbezug der Mikrowellenleistung sowie der Temperaturabhängigkeit des tYap5/N1-4 ESR-Spektrums. Diese Daten legen eine Mischung aus [2Fe-2S]- und wahrscheinlich [4Fe-4S]-Zentren an der c-CRD nahe. Der substöchiometrische Anteil des [4Fe-4S]-Clusters (~ 20 %) ist ebenfalls im Mößbauer-Spektrum des Wildtyp tYap5 dokumentiert. Des Weiteren wird auch im ESR eine zusätzliche [4Fe-4S]-Komponente sichtbar, wenn tYap5 mehr  $\text{Fe}^{2+/3+}$  und  $\text{S}^{2-}$  inkorporieren kann, als für ein [2Fe-2S]-Cluster nötig wäre. Dies zeigte sich z.B. bei einer chemischen Rekonstitution mit 8-fachem molaren Überschuss an  $\text{Fe}^{3+}$ - und  $\text{S}^{2-}$ -Ionen relativ zum Protein. Ob Yap5 *in vivo* wirklich beide Cluster-Typen trägt oder diese nur bei der chemischen Rekonstitution *in vitro* entstehen, bleibt unklar. Das Sequenzmotiv von Yap5 in der c-CRD ist im Gegensatz zur n-CRD nicht sonderlich konserviert und nur in wenigen anderen Transkriptionsfaktoren auffindbar (s. Abb. 2-27 B). In dieser Arbeit, wie auch bei Li *et al.* (2008) gezeigt, konnten keine Hinweise auf eine regulatorische Funktion der Cysteine der c-CRD erbracht werden. Des Weiteren ergab auch die radioaktive Eisenmarkierung *in vivo* keinen Hinweis auf das Vorhandensein eines Fe/S-Clusters an der c-CRD. Zusammenfassend zeigt sich, trotz einer gut dokumentierten Bindung eines Fe/S-Clusters am c-CRD *in vitro*, bisher keine funktionelle Relevanz eines solchen Clusters für Yap5 in *S. cerevisiae*.

Eine weitere wichtige Fragestellung dieser Arbeit war, wie die Bindung eines Fe/S-Cofaktor-Sensors zur transkriptionellen Aktivierung von Yap5 führen könnte. Der  $\text{Fe}^{2+/3+}$ - und  $\text{S}^{2-}$ -Gehalt von je 1 Ion pro Monomer bei tYap5/N1-4 und tYap5/C1-3 deutet auf einen gebrückten [2Fe-2S]-Cluster an der n-CRD bzw. c-CRD hin. Es erscheint unwahrscheinlich, dass ein Fe/S-Cluster in einem symmetrischen Homodimer nur auf



einer Hälfte bindet. Der  $\text{Fe}^{2+/3+}$ - und  $\text{S}^{2-}$ -Gehalt von 2 pro Monomer im Wildtyp tYap5 deutete daher auf zwei gebrückte Fe/S-Cluster in Wildtyp Yap5 hin. Strukturanalysen der DNA-Bindedomäne von bZIP-Transkriptionsfaktoren zeigen, dass diese über die Leucinreste in einer *coil-coil* Struktur der Leucin-Zipper Domäne dimerisieren (Fujii *et al.* 2000). Obwohl eine Dimerisierung für die DNA-Bindung essentiell ist, können bZIP-Transkriptionsfaktoren auch ohne DNA als Dimere vorliegen, wie z.B. die AP-1 Transkriptionsfaktoren c-Jun und c-Fos (Seldeen *et al.* 2008). Für Yap5 gibt es in der Literatur Hinweise auf eine konstitutive, eisenunabhängige Bindung an der *Yap consensus sequence* des *CCC1* Promotors (Li *et al.* 2008). Dies wiederum würde eine konstitutive Dimerisierung von Yap5 voraussetzen und folglich eine über die Fe/S-Cluster Bindung induzierte Dimerisierung ausschließen. Die einfachste vorstellbare Funktionsweise von Yap5 wäre daher, dass die Bindung eines gebrückten Fe/S-Clusters eine Konformationsänderung der Aktivator-domäne von Yap5 vermittelt, die anschließend eine Aktivierung der transkriptionellen Aktivität von Yap5 auslöst. Die Daten dieser Arbeit belegen in diesem Zusammenhang, dass die Aktivator-domäne von Yap5 auch ohne die bZIP DNA-Bindedomäne ein Dimer ist. Es konnte mittels Gelfiltrationschromatographie gezeigt werden, dass diese Dimerisierung unabhängig von den Cysteinen der n- und c-CRD erfolgt. Mittels Proteinstrukturanalysen [PredictProtein.org] lassen sich  $\alpha$ -helikale und *coil-coil* Strukturen in den ersten ~ 20 Aminosäureresten von tYap5 vorhersagen, die als Protein-Protein Interaktionsoberfläche zur Dimerisierung dienen könnten. Des Weiteren stellte sich heraus, dass die Fe/S-Cluster Bindung eine Konformationsänderung der bereits als Dimer vorliegenden Aktivator-domänen von tYap5 hin zu einer kompakteren Struktur verursachte. Da diese Strukturänderung zwei bereits verbundene Monomere betrifft, scheint die Aktivator-domäne wie eine Muschel zu funktionieren, die sich in Abhängigkeit von der Bindung des Fe/S-Cluster-Sensors öffnet und schließt. Diese Fe/S-Cluster-induzierte Konformationsänderung könnte die Transkription aktivieren und deaktivieren. Obwohl die bZIP DNA-Bindedomäne im rekombinanten tYap5 fehlt, liegen die Aktivator-domänen als Dimere vor. Daher lassen sich die Resultate zur Konformationsänderung auf ein Model zur Funktionsweise des vollständigen Transkriptionsfaktors Yap5 übertragen. Weiterführende Strukturanalysen, wie Kristallografie, NMR aber auch HDE (Hydrogen–Deuterium Exchange) könnten zur Verifizierung dieses Muschel-Models beitragen. Die Konformationsänderung zwischen offener (Apo) und geschlossener Fe/S-Cluster-bindender Holo-Form konnte auch bei den Mutanten tYap5/N1-4 und tYap5/C1-3 beobachtet werden. Dies deutet daraufhin, dass die beiden Fe/S-Cluster an der n-CRD und der c-CRD prinzipiell jeweils alleine in der Lage sind, eine Eisen-abhängige transkriptionelle Aktivierung von Yap5 zu vermitteln. Diese Beobachtung stimmt mit den *in vivo* Daten gut überein, die belegen, dass

der Fe/S-Cluster an der n-CRD alleine für eine Eisen-abhängige Regulation von Yap5 ausreichend ist.

In Übereinstimmung mit einer Rolle des Yap5 als Eisensensor reagieren die gebundenen Fe/S-Cofaktoren empfindlich auf Unterschiede in der Eisenkonzentration und werden *in vitro* in Gegenwart von Metallchelatoren innerhalb Minuten zerstört. Fe/S-Cofaktoren sind aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegenüber Reduktionsmitteln ebenfalls als Redoxsensoren geeignet. Im bakteriellen FNR1 (Fumarat- und Nitrat-Reduktion Regulator) beispielsweise dient ein [4Fe-4S]-Cluster als Sauerstoffsensor (Crack *et al.* 2012a, Crack *et al.* 2012b). Sauerstoff verringert dagegen die Clusterbindung an tYap5 *in vitro* erst nach Stunden und hohe Konzentrationen von Glutathion haben überhaupt keinen Effekt auf die Stabilität der tYap5 gebundenen Fe/S-Cluster. Entsprechend gibt es in *S. cerevisiae* keine Indizien auf eine Beteiligung von Yap5 an einer transkriptionellen Antwort auf oxidativen Stress (Herrero *et al.* 2008, Li *et al.* 2011).

Zusammenfassend zeigten diese Daten, dass der bZIP-Transkriptionsfaktor Yap5 *in vitro* neben der bZIP-Domäne ebenfalls über die Aktivator-domäne dimerisiert und über die Bindung eines Fe/S-Cluster-Sensors eine zusätzliche Konformationsänderung hin zu einer kompakteren Struktur erfährt. Dabei stellt sich die Frage, wie die Fe/S-Cluster-induzierte Konformationsänderung der Aktivator-domäne von Yap5 die Transkription vermitteln könnte? Eine Möglichkeit wäre, dass die Fe/S-Cluster-induzierte Konformationsänderung direkt den Auslöser der transkriptionellen Aktivierung von *CCC1* darstellt indem die geänderte Konformation eine Bindungsstelle für RNA-Polymerasen oder Transkriptionsinitiationsfaktoren bietet und diese so an die von Yap5 besetzten Promotoren rekrutiert. Alternativ könnte die Apo-Form Bindungsstellen für RNA-Polymerasen oder Initiationsfaktoren auf der DNA maskieren, die bei Fe/S-Cluster Bindung freigelegt wird. Diese Modelle würden mit der Hypothese einer konstitutiven Yap5 DNA-Bindung übereinstimmen (Li *et al.* 2008).

Die konstitutive Anwesenheit im Nukleus ist keine typische Erscheinung von Transkriptionsfaktoren der Yap-Familie (Delaunay *et al.* 2000, Rodrigues-Pousada *et al.* 2010). Li *et al.* (2008) belegten ihre konstitutive DNA-Bindung des Yap5 anhand einer Eisen-unabhängigen, nukleären Lokalisation eines Yap5-GFP Fusionsproteins und der Eisen-unabhängigen DNA-Bindung in ChIP-Analysen (Li *et al.* 2008, Pimentel *et al.* 2012). Es ist jedoch bekannt, dass GFP *per se* bereits zur nukleären Lokalisation führen kann (Seibel *et al.* 2007). Dagegen zeigen Studien von Delaunay *et al.* (2000) zur Funktionsweise des oxidativen Stresssensors Yap1 in *S. cerevisiae*, dass Yap1 einen aktiven Transfer zwischen Kern und Cytosol in Abhängigkeit vom Redoxstatus der Zelle durch-

führt (Delaunay *et al.* 2000, Delaunay *et al.* 2002). Die Autoren gehen davon aus, dass es bei erhöhter Konzentration von ROS, wie z.B. Wasserstoffperoxid, zur Disulfidbrückenbildung in der Aktivator-domäne von Yap1 kommt. Dies verursacht eine Konformationsänderung, die wiederum ein nukleäres Exportsignal (NES) von Yap1 maskiert. Die resultierende Akkumulation von Yap1 im Nukleus aktiviert die transkriptionelle Stressantwort und erlaubt zusätzlich die Anpassung der Stärke der Stressantwort an die Größe des vorhandenen Stresses (Delaunay *et al.* 2000, Delaunay *et al.* 2002, Kuge *et al.* 1997). Yap2 (Cad1) ist ebenfalls im Cytosol lokalisiert, und erst bei oxidativen Stress oder erhöhten Cadmium-Konzentration ist ein rapider Transfer in den Nukleus zu beobachten, wobei der genaue Mechanismus für Yap2 noch unbekannt ist (Bilsland *et al.* 2004). Das Programm NetNES1.1 zur Identifizierung von NES-Sequenzen sagt in Yap5 ebenfalls mögliche Exportsignale voraus (Abb. 3-3) (la Cour *et al.* 2004, Rodrigues-Pousada *et al.* 2010). Dabei wird von zwei unabhängigen Programmen ein NES-Signal vor der n-CRD von Yap5 vorhergesagt (Aminosäuren 120 - 131: LKQKLETTLT) (la Cour *et al.* 2004). Ein Sequenzvergleich der Yap1 und Yap2 NES-Sequenzen mit Yap5 zeigte zusätzlich ein verwandtes Motiv in der c-CRD von Yap5. Des Weiteren lassen sich nukleäre Importsignale in der bZIP-Domäne des Proteins finden. Ein Transfer von Yap5 zwischen Nukleus und Cytosol in Abhängigkeit vom Eisenstatus der Zellen ist daher durchaus möglich. Die Bindung des Fe/S-Clusters an der Aktivator-domäne und die dadurch induzierte Konformationsänderung könnte wie bei Yap1 zur Maskierung des NES-Signals führen. Dieses zweite Modell eines Transfers zwischen Kern und Cytosol wird u.a. auch durch Ergebnisse zum Yap1 aus *Ustilago maydis* untermauert, dem Ortholog des *S. cerevisiae* oxidativen Stresssensor Yap1. Erst die Anwesenheit von Wasserstoffperoxid führt zur Kernlokalisierung von Yap1 in *U. maydis* (Molina & Kahmann 2007). Das *Ustilago* Yap1 hat eine n-CRD Domäne mit hoher Homologie zu Yap5, die essentiell für seine Funktion ist. In unmittelbarer Nähe der n-CRD ist ein NES-Signal lokalisiert (Abb. 3-3). Dieses könnte durch eine Modifikation an der n-CRD in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> maskiert werden und so eine nukleäre Akkumulation von Yap1 auslösen.

Zusammengefasst wurde Yap5 als erster eukaryotischer Transkriptionsfaktor mit einem sensorischen Fe/S-Cluster charakterisiert, dessen Bindung eine Konformationsänderung *in vitro* auslöst. Diese könnte zur Maskierung der NES-Sequenz von Yap5 führen. Die daraus resultierende Akkumulation im Nukleus könnte die DNA-Bindung und Transkription von *CCC1* vermitteln. Zukünftige Versuche müssen klären, ob Yap5 konstitutiv im Kern verweilt oder aktiv zwischen Kern und Cytosol transloziert wird. Dazu könnten die bisherigen Fluoreszenz-mikroskopischen Versuche mit veränderten

GFP optimiert werden, oder einem anderen fluoreszierenden Proteintag durchgeführt werden. Alternativ wären auch EMSA-Experimente (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) mit aufgereinigtem Yap5-Volllängenprotein denkbar.

### 3.3 Der bZIP-Transkriptionsfaktors HapX zeigt strukturelle Ähnlichkeiten zu der Fe/S-Cluster-bindenden Domäne von Yap5

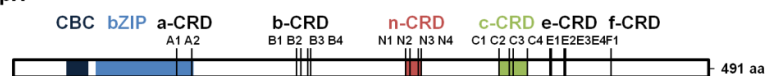
In *Aspergillus fumigatus* sind keine zu Yap5 und Aft1/Aft2 Transkriptionsaktivatoren bekannt. Die Eisenversorgung des Schimmelpilzes wird dagegen über den GATA-Transkriptionsfaktor SreA und den bZIP-Transkriptionsfaktor HapX reguliert. Unter Eisenmangel reprimiert HapX eisenverbrauchende Stoffwechselprozesse. Dagegen wird bei Eisenüberschuss die Eisenaufnahme durch SreA verringert. Parallel dazu regulieren sich die Transkriptionsfaktoren gegenseitig in einer sog. negativen Rückkopplungsschleife (Schrettl & Haas 2011) (s. Abb. 1-5). Trotz dieser eindeutigen mechanistischen Unterschiede in der Regulation der Eisenhomöostase, gibt es bei HapX und Yap5 ähnliche Sequenzmotive. Das betrifft nicht nur die bZIP DNA-Bindedomäne, sondern auch die konservierten Cystein-reichen-Domänen, wobei insbesondere die n-CRD von HapX das gleiche CGFCX<sub>5</sub>CXC-Motiv aufweist wie Yap5 (s. Abb. 2-27 und Abb. 3-2 sowie Abb. 3-3). Des Weiteren identifizierten Proteinsequenzvergleiche mittels BLASTP und phylogenetische Analysen Homologe zum vakuolären Metallimporter Ccc1 aus *S. cerevisiae* in 68 von 76 getesteten Pilzgenomen (Gsaller *et al.* 2012). Gsaller *et al.* konnten ebenfalls belegen, dass die n-CRD in HapX entscheidend für die transkriptionelle Aktivierung von *CccA* in *Aspergillus* via HapX ist (Publikation in Vorbereitung). In Hinblick auf die vergleichbare Funktion von Yap5 in der Aktivierung von *CCC1* und HapX in der Aktivierung von *CccA*, erscheint die Bindung eines ebenfalls sensorischen Fe/S-Clusters in der n-CRD von HapX wahrscheinlich. In dieser Arbeit konnte anhand der Überexpression der Aktivator-domäne von HapX in *S. cerevisiae* die Assemblierung eines ISC- und CIA-abhängigen Fe/S-Cofaktors belegt werden. Jedoch erwies sich die Bestimmung der koordinierenden Cysteine als schwierig, da Modifikationen von Cysteinen in HapX im Gegensatz zu Yap5 oft zur Destabilisierung des Proteins und dessen proteolytischen Abbau führte. Darüber hinaus gibt es keine Indizien auf eine Eisenbindung in der n-CRD von HapX, wenn das Protein in *S. cerevisiae* exprimiert wird. Am ehesten war die Koordination eines Fe/S-Clusters in der c-CRD wahrschein-

lich, da bei Substitution der Cysteine dieser Domäne die Eisenbindung sank, HapX jedoch mit Myc Antikörpern nachweisbar war. Zur weiteren Untersuchung wären Austausche von mehreren bzw. allen Cysteinresten in einer einzelnen Domäne (z.B. N1-4 und C1-4) sowie die Charakterisierung des rekombinanten HapX Proteins *in vitro* nötig. Allerdings ist die Analyse von HapX mit seinen 19 Cysteinresten und der inhärenten Instabilität der Apoform stark erschwert.

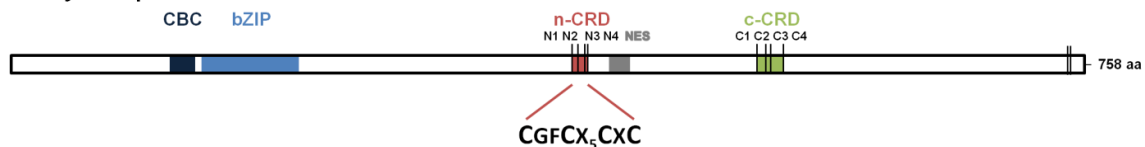
#### *S. cerevisiae* Yap5



#### *A. fumigatus* HapX



#### *U. maydis* Yap1



**Abb. 3-3 Die Domänenstruktur der bZIP-Transkriptionsfaktoren Yap5, HapX und Yap1 aus verschiedenen Pilzen zeigen konservierte Cystein-reiche Motive.** Der Vergleich der Proteindomänen von *S. cerevisiae* Yap5, *A. fumigatus* HapX und *U. maydis* Yap1 zeigt einen ähnlichen strukturellen Aufbau der bZIP-Transkriptionsfaktoren. Besonders auffällig ist die Anordnung der Cysteine in sog. Cystein-reiche Domänen. Dabei ist das konservierte CGFCX<sub>5</sub>CXC-Motiv in allen drei n-CRDs vorhanden. (bZIP: basischer Leucin-Zipper; CBC: CCAAT-binding complex / Hap4-ähnliche Domäne; CRD: Cystein-reiche Domäne; NES: nukleäres Exportsignal).

Dagegen weist Yap1 von *Ustilago maydis* nur 10 Cysteinreste auf (Molina & Kahmann 2007). Des Weiteren kodiert dieser Peroxid-Sensor zwei CRDs, n- und c-CRD, die ähnlicher zu HapX bzw. Yap5 als zu Yap1 von *S. cerevisiae* sind (s. Abb. 2-27 und Abb. 3-3). Im Gegensatz zur Yap-Familie in *S. cerevisiae* existiert in HapX von *A. fumigatus* und in Yap1 von *U. maydis* eine zusätzliche Hap4-ähnliche Domäne, die auch CBC-Komplex (CCAAT-binding complex) genannt wird. Der HAP-Komplex ist in allen Eukaryoten konserviert. In *S. cerevisiae* besteht dieser aus dem trimeren Komplex Hap2, Hap3 und Hap5, homolog zu den Mammalia NF-YA, NF-YB und NF-YC (Mantovani 1999) und dem zusätzlichen Regulator Hap4 (McNabb & Pinto 2005). Der HAP-Komplex ist in der Hefe für die Aktivierung von respiratorischen Genen essentiell, jedoch hat der Aktivator Hap4 keine direkte Funktion in der Eisenhomöostase (Kaplan *et al.* 2006, Ihrig *et al.* 2010). Im Gegensatz zu Hap4 bindet HapX in *Aspergillus* bei Eisenmangel über die CBC-Domäne an den HapC/HapB/HapE-Komplex und reprimiert

u.a. die Häm-Biosynthese und Gene der Respiration (Hortschansky *et al.* 2007). Das *Ustilago* Yap1 codiert im Gegensatz zum Yap1 Ortholog von *Saccharomyces* nicht nur eine Yap5 bzw. HapX ähnliche n-CRD und c-CRD, sondern auch eine CBC-Domäne zur Bindung an den HAP-Komplex. Bei näherer Betrachtung wirkt der Aufbau von Yap1 aus *U. maydis* wie eine Chimäre aus dem Eisenregulator HapX und dem oxidativen Stresssensor Yap1 aus *S. cerevisiae* (Abb. 3-3). Untersuchungen zur zusätzlichen Funktion von Yap1 in der Eisenhomöostase oder zur Rolle eines Fe/S-Clusters als möglicher Sensor für oxidativen Stress in *U. maydis* könnten aufschlussreiche Einblicke über die evolutionäre Entwicklung der Eisenregulation zwischen *Ascomyceten* und *Basidiomyceten* geben. Da Yap1 einfacher aufgebaut ist und weniger Cysteinreste als HapX aufweist, würde es eine gute Alternative für weitere Studien darstellen. Im Gegensatz zu *A. fumigatus* könnten Experimente mit radioaktiver Eisenmarkierung von Yap1 direkt in *U. maydis* durchgeführt werden. Molina *et al.* (2007) zeigten bereits, dass die Cysteinreste-399 und -407, die sich in der n-CRD befinden, entscheidend für die Funktionalität des *Ustilago* Yap1 sind. Was die genaue Funktion der Cysteinreste ist, wurde jedoch nicht gezeigt.

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der Arbeit die direkte Bindung eines regulatorischen Fe/S-Clusters in der n-CRD von *S. cerevisiae* Yap5 gezeigt werden. HapX aus *A. fumigatus* bindet ebenfalls einen Fe/S-Cofaktor, auch wenn die koordinierende-CRD noch nicht abschließend identifiziert werden konnte. Allerdings belegt die Literatur eine regulatorische Funktion der n-CRD sowohl in *A. fumigatus* HapX als auch in *U. maydis* Yap1 (Molina & Kahmann 2007) (Gsaller *et al.* Manuskript in Vorbereitung). Letztendlich stellt sich die Frage, ob das CGFCX<sub>5</sub>CXC-Motiv in den Aktivator-domänen von Transkriptionsfaktoren der Pilze als konservierte Bindungsstelle für einen sensorischen Fe/S-Cluster fungieren könnte. Eine Fe/S-Cluster Bindung in der n-CRD des *Ustilago* Yap1 wäre ein weiteres Indiz für diese Hypothese.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Geräte

Tabelle 4-1 Geräteliste

Gerät	Bezeichnung (Hersteller)
Anaerobenkammer	Coy Laboratory Products Inc.
Autoklaven	Tuttnauer 2540 EL (Tuttnauer Europe B.V.), Systec V-150 (Systec GmbH)
Blotapparatur	Semi-dry Blotter Sedec M (Peqlab), Mini Trans-Blot® Cel (Bio-Rad)
Dokumentationssystem für Agarosegele für Chemilumineszenz	Gel iX Imager (Intas) Chemostar Professional (Intas)
Elektrophoresesysteme für Agarosegele für SDS-PAGE	B1A (Owl Separations Systems) Minigel-Twin (Biometra), Mini-PROTEAN® (Bio-Rad)
Emulsifier	EmulsiFlex® C3 (Avestin)
ESR-Spektrometer	ESP 300E (Bruker)
Inkubatoren	Multitron (Infors HT), Steril-Cult Incubator (Forma Scientific), Function-Line (Heraeus)
Fluoreszenzspektrometer	FP-6300 (Jasco)
FPLC-System	AKTA™purifier 10 mit Monitor UV-900, Fraktionssammler Frac-950 (GE Healthcare)
HPLC-System	515 HPLC Pumpe, 2487 Dual $\lambda$ Absorbance Detector, Millenium software (Waters GmbH)
pH-Meter	Lab 850 (Schott Instruments)
Plattenlesegerät	InfiniteR M200 (Tecan)
Reinstwasseranlage	Elix 5 (Millipore)
Spannungsquellen	Power Supply EPS 600 (Pharmacia Biotech),

	EC105 (E-C Apparatus Corporation)
<b>Spektrometer (CD)</b>	CD Spectrometer J-815 (Jasco)
<b>Spektrophotometer (OD)</b>	Genesys 2 (Thermo Scientific)
<b>Spektralphotometer (UV/VIS)</b>	U-550 (Jasco)
<b>Sterilbank</b>	Labgard Class II (IBS Integra Biosciences)
<b>Sterilisator</b>	Modell 700 (Mettler)
<b>Szintillationscounter</b>	LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter (Beckmann)
<b>Thermocycler</b>	Advanced primus 25 (PqLab), UNO-Thermoblock (Biometra)
<b>Thermomixer</b>	Thermomixer 5436 (Eppendorf)
<b>Ultraschall-Homogenisator</b>	Sonopuls (Bandelin)
<b>Ultrazentrifuge</b>	Optima TL (Beckmann Coulter)
<b>Vortex</b>	Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)
<b>Waagen</b>	PT 1500 (Sartorius), SBC22 (Scaltec), PCB (Kern)
<b>Wippschüttler</b>	ST5 (Ingenieurbüro CAT)
<b>Zentrifugen</b>	Biofuge pico (Heraeus), 3K30 (Sigma), Megafuge 1.0R (Heraeus), Avanti J20 XP (Beckmann)

## 4.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden in mindestens 99 % oder der höchsten verfügbaren Qualität verwendet, und von den Firmen Sigma-Aldrich, Roth, Merck KGaA, Serva, Difco Laboratories, GE Healthcare oder AppliChem bezogen.

Tabelle 4-2 Chemikalienliste

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
<sup>55</sup> Fe-Eisenchlorid, 10 mCi/ml, 30 mCi/mg	Perkin Elmer
Aceton	Roth
Acrylamid-Stammlösung (Rotiphorese Gel 30)	Roth
Adeninsulfat	AppliChem
Agar	Roth



<b>Aminosäuren</b>	Merck, Sigma
<b>Ammoniumperoxodisulfat (APS)</b>	Roth
<b>Ammoniumbismuthcitrat</b>	Fluka
<b>Ammoniumsulfat</b>	Roth
<b>Ampicillin</b>	Sigma Aldrich
<b>Ascorbinsäure</b>	Sigma Aldrich
<b>Bacto Pepton, Bacto Trypton</b>	DIFCO
<b>Bradford-Reagenz</b>	BioRad
<b>Brilliant Blau G250</b>	Roth
<b>Bromphenolblau</b>	Roth
<b>Calciumchlorid</b>	Merck
<b>Casein Pepton</b>	MP Biomedical
<b>ClonNAT (Nurseothricin)</b>	WernerBioagents
<b>Cycloheximid</b>	Sigma Aldrich
<b>Coomassie R250</b>	Roth
<b>Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)</b>	Peqlab
<b>DMPD</b>	Roth
<b>DMSO</b>	AppliChem
<b>DT</b>	Fluka
<b>DTT</b>	Roth
<b>EDTA</b>	Acros Organics
<b>EGTA</b>	Acros Organics
<b>Eisen(III)ammoniumcitrat</b>	Sigma Aldrich
<b>Eisen(III)chlorid Hexahydrat</b>	Sigma Aldrich
<b>Eisen(II)chlorid Tetrahydrat</b>	Sigma Aldrich
<b>Essigsäure</b>	Roth
<b>Ethanol</b>	Roth
<b>Feren</b>	Sigma
<b>GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain</b>	Biotium
<b>Galactose</b>	AppliChem
<b>Geneticindisulfat (G418)</b>	Roth
<b>Glucose Monohydrat</b>	Roth
<b>Glycerin</b>	Roth
<b>Hefeextrakt</b>	Roth
<b>Hepes</b>	Roth
<b>Imidazol</b>	AppliChem
<b>Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)</b>	Roth
<b>LE Agarose</b>	Biozym
<b>Lithiumsulfid</b>	Sigma Aldrich
<b>Magnesiumchlorid</b>	Fluka
<b>Mercaptoethanol</b>	Roth
<b>Methanol</b>	Roth
<b>Natrium-Citrat</b>	Roth

<b>Natriumchlorid</b>	Roth
<b>Natriumdodecylsulfat (SDS)</b>	Roth
<b>Natriumdihydrogenphosphat</b>	Roth
<b>di-Natriumhydrogenphosphat</b>	Roth
<b>Natriumhydroxid</b>	AppliChem
<b>Ni Sepharose™ High Performance</b>	GE Healthcare
<b>Phenylmethanolsulfonylfluorid (PMSF)</b>	AppliChem
<b>Polyethylenglycol (PEG) 4000</b>	Roth
<b>Salzsäure</b>	Roth
<b>Szintillations-Cocktail Ultima Gold</b>	Perkin Elmer
<b>TEMED</b>	Sigma Aldrich
<b>Trichloressigsäure (TCA)</b>	Roth
<b>Tris</b>	Roth
<b>Triton-X100</b>	Sigma Aldrich
<b>Tween 20</b>	Sigma Aldrich
<b>Yeast Nitrogen Base</b>	Formedium
<b>Zinkacetat</b>	Sigma Aldrich

Tabelle 4-3 Komplettsysteme

<b>Komplettsysteme</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Enhanced Chemiluminescence System (ECL)</b>	GE Healthcare
<b>Luciferase Assay System</b>	Promega
<b>NucleoSpin® Plasmid</b>	Macherey-Nagel
<b>NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up</b>	Macherey-Nagel

#### 4.2.1 Größenstandards

Als Größenstandard für die Agarosegelelektrophorese wurde der „GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder“ (Fermentas) verwendet. Für die SDS-PAGE wurde ebenfalls von der Firma Fermentas das Produkt „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ benutzt.

#### 4.2.2 Enzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Fermentas oder New England Biolabs bezogen. Außerdem wurden folgende weitere Enzyme verwendet: Phusion DNA Polymerase (Finnzymes), Tag DNA Polymerase (Thermo Scientific), T4 DNA Ligase (New England Biolabs), RNase A (Roth) sowie die Zymolyase 100T (nacalai tesque).

#### 4.2.3 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide (*Primer*) wurden entsalzt und lyophilisiert von der Firma Metabion bezogen und sind nachfolgend nach Verwendung sortiert aufgelistet.

**Tabelle 4-4 Oligonukleotide zur Konstruktion von PCR-Kassetten für die chromosomale Gendeletionen in *S. cerevisiae* (unter Verwendung der PCR-toolbox; (Janke *et al.* 2004))**

Gendeletion	Name	Sequenz (5'→3')
<b>YAP5</b>	<i>yap5Δ</i> -S1-1f	CAA CAA GTT CAC ACA ACA TAA ACA GTG TAA CTA GCA TAT TAT CAC AGT CAT GCGT ACG CTG CAG GTC GAC
	<i>yap5Δ</i> -S2-1r	GTT GAG CTG TTC AAT GAC GTA TTT ATA AGT ATT AAG AAG TTC TCT CTC TTC A A TCG ATG AAT TCG AGC TC
	<i>yap5Δ</i> -control-1f	CGA AAG ATT GTT CAC GTT CAT AC
<b>RIM2</b>	<i>rim2Δ</i> -S1-N-Nat	AAG ATG CCT AAA AAA TCC ATT GAA GAA TGG GAA GAG GAT GCC ATT GAA TCG TAC GCT GCA GGT CGA C
	<i>rim2Δ</i> -S2-C-Nat	GGC TAC GAT AGT AGC CTT ATA ACA ATT TCC CAT GTA CCA AAC ATA ATT ATC GAT GAA TTC GAG CTC G
	<i>rim2Δ</i> -control-1f	GTT CCA TAC GAA ACT TTC ATC

**Tabelle 4-5 Oligonukleotide zur Konstruktion heterologer Genexpressionsvektoren in *E. coli*.**

Name	Sequenz (5'→3')
<b>YAP5CTD-N-NdeI-2f</b>	GGA ATT CCA TAT GTC GGA AAA TCA TGC CCT TAA
<b>YAP5CTD-C-BamHI-1r</b>	GGT ACG CGG ATC CTC TCT CTT CAG TGG ATG ATG

**Tabelle 4-6 Oligonukleotide zur Konstruktion von Genexpressionsvektoren für *S. cerevisiae***

Name	Sequenz (5'→3')
<b>YAP5t120-N-SpeI</b>	GTT GGA CTA GTA TGG CCC TTA AAC AGA AAT TGG
<b>YAP5-Myc-C-EcoRI</b>	TTG CTC GAA TTC GTG GAT GAT GGA CCG GAT GTC
<b>YAP5-HA-C-SmaI-1r</b>	GAC TAA CCC GGG AGT GGA TGA TGG ACC GGA TG
<b>Myc-YAP5t120-SpeI-1f</b>	GTA TTG ACT AGT ATG GUC GAA CAG AAA CTG ATC TCT GAA GAA GAC CTG GCC CTT AAA CAG AAA TTG GAG
<b>YAP5-EcoRI-1r</b>	CGA TAC GAA TTC TCA GTG GAT GAT GGA CCG G
<b>YAP5-fl-SpeI-1f</b>	GAC ATA GGA CTA GTC ATG GCT CTA CCT CTG
<b>pCCC1-SacI-1f</b>	GTT CTC GGA GCT CTG CCG CTG AGC CAA CAA TGG
<b>pCCC1-EcoRI-1r</b>	GCC GGA ATT CAA TAT TTG TGT GCA CGA GAT ATG
<b>pCCC1--296-SacI-1f</b>	GTT CTC GGA GCT CAT ACC CTC TTC TCA TTG G
<b>HapX-E195-SpeI-1f</b>	GTC TAG ACT AGT ATG GAG GTA CCG TTA GGC TGC
<b>HapX-C-Myc-EcoRI-1r</b>	GGT TTG CCG AAT TCT TTG TCG GCA AAC CGT CCG

Tabelle 4-7 Oligonukleotide zur *in vitro* Mutagenese von *YAP5*

Yap5-variante	Ams-austausch	Name	Sequenz (5'→3')
<b>N3</b>	C187A	Yap5-mut-N3-1f	CTA CTG CCG TTT GTA AAG AAC TGG AAA C
		Yap5-mut-N3-1r	CAA ACG GCA GTA GTG TTG TCG TTA CAA AAG C
<b>N4</b>	C189S	Yap5-mut-N4-1f	GTT TCT AAA GAA CTG GAA ACA GAT CAC CG
		Yap5-mut-N4-1r	CTT TAG AAA CGC AAG TAG TGT TGT CGT TAC
<b>N12</b>	C178A C181A	Yap5-mut-N1N2-1f	GTC AAA GCC GGC TTT GCT AAC GAC AAC ACT AC
		Yap5-mut-N1N2-1r	CGT TAG CAA AGC CGG CTT TGA CAG AGC TAG GCA G
<b>N34</b>	C187A C189A	Yap5-mut-N3N4-2f	CAC TAC TGC CGT TGC TAA AGA ACT GGA AAC AGA TCA CCG TAA AAG TGA CG
		Yap5-mut-N3N4-1r	CTT TAG CAA CGG CAG TAG TGT TGT CGT T
<b>C12</b>	C227A C230A	Yap5-mut-C2-1f	GTA ATG CTA CTA ATA TCG ACA AAT CAT GTA TC
		Yap5-mut-C2-1r	GAT ATT AGT AGC ATT ACT ACA GAG CCC ATT G
<b>C2</b>	C230A	Yap5-mut-C1C2-1f	GCT CGC TAG TAA TGC TAC TAA TAT CGA CAA ATC
		Yap5-mut-C1C2-1r	TAG TAG CAT TAC TAG CGA GCC CAT TGG GGT TAT C
<b>C3</b>	C237A	Yap5-mut-C3-2f	CAA ATC AGC TAT CGA CAT CCG GTC CAT C
		Yap5-mut-C3-2r	CGA TAG CTG ATT TGT CGA TAT TAG

#### 4.2.4 Plasmide

Die Richtigkeit der DNA-Sequenzen wurde durch DNA-Sequenzierung (Firma Seqlab) überprüft und folglich sichergestellt.

Tabelle 4-8 Verwendete Plasmide

Plasmid-Name	ORF	Promotor (bp)	Ausgangs-plasmid	Referenz
<b>p426-BIO2</b>	<i>BIO2</i>	<i>TDH3</i>	p426- <i>TDH3</i>	(Muhlenhoff <i>et al.</i> 2002a)
<b>pFET3-GFP</b>	<i>GFP</i>	<i>FET3</i>	p416- <i>MET25</i>	(Hausmann <i>et al.</i> 2008)
<b>pFIT3-GFP</b>	<i>GFP</i>	<i>FIT3</i>	p416- <i>MET25</i>	(Froschauer <i>et al.</i> 2013)
<b>pCM189-RIM2</b>	<i>RIM2</i>	<i>CMV-TetO<sub>7</sub></i>	pCM189	(Froschauer <i>et al.</i> 2013)
<b>pRIM2-RIM2</b>	<i>RIM2</i>	<i>RIM2</i>	YCplac33	(Froschauer <i>et al.</i> 2013)

<b>p426-t YAP5-myc</b>	YAP5; Δ0-H119; C-terminal <i>Myc-tag</i>	<i>TDH3</i>	p426- <i>TDH3</i> (Funk <i>et al.</i> 2002)	diese Arbeit
<b>p426-myc-t YAP5</b>	YAP5; Δ0-H119; N-terminal <i>Myc-tag</i>	<i>TDH3</i>	p426- <i>TDH3</i> (Funk <i>et al.</i> 2002)	diese Arbeit
<b>p424-t YAP5-HA</b>	YAP5; Δ0-H119; C-terminal <i>HA-tag</i>	<i>TDH3</i>	p426- <i>TDH3</i> (Funk <i>et al.</i> 2002)	diese Arbeit
<b>p424- YAP5</b>	YAP5; C-terminal <i>Myc-tag</i> ;	<i>TDH3</i>	p424- <i>TDH3</i> (Funk <i>et al.</i> 2002)	diese Arbeit
<b>pET15b-t YAP5</b>	YAP5; Δ0-E115; N-terminal <i>His-tag</i>	<i>T7 lac</i>	pET15b	diese Arbeit
<b>p416-pCCC1-LUX</b>	<i>LUC2</i>	<i>CCC1</i> (-600 - -1)	p416-Luc2 (Molik <i>et al.</i> 2007)	diese Arbeit
<b>p416-pCCC1-(-289)LUX</b>	<i>LUC2</i>	<i>CCC1</i> (-298 - -1)	p416-Luc2 (Molik <i>et al.</i> 2007)	diese Arbeit
<b>p416-pCCC1-(-416-286)-pLEU1-LUX</b>	<i>LUC2</i>	<i>LEU1</i> (-175 - -1) <i>CCC1</i> (-416 - -286)	pLEU1-luc2 (Ihrig <i>et al.</i> 2010) pUC57 (GenScript)	diese Arbeit
<b>p426-pCCC1-LUX</b>	<i>LUC2</i>	<i>CCC1</i> (-600 - -1)	p426- pCCC1-LUX	diese Arbeit
<b>p426-pCCC1-(-416-286)-pLEU1-LUX</b>	<i>LUC2</i>	<i>LEU1</i> (-175 - -1) <i>CCC1</i> (-416 - -286)	pLEU1-luc2 (Ihrig <i>et al.</i> 2010) pUC57 (GenScript)	diese Arbeit
<b>p426-HapX-CTD</b>	<i>HapX</i> ; Δ0-E194; C-terminal <i>Myc-tag</i>	<i>TDH3</i>	p426- <i>TDH3</i> (Funk <i>et al.</i> 2002) und phapX <sup>R</sup> -hph (Fabio Gsaller)	diese Arbeit
<b>p424-HapX</b>	<i>HapX</i> ; C-terminal <i>Myc-tag</i>	<i>TDH3</i>	p426- <i>TDH3</i> (Funk <i>et al.</i> 2002) und phapX <sup>R</sup> -hph (Fabio Gsaller)	diese Arbeit

#### 4.2.5 Hefestämme

Verwendet wurden folgende Stämme:

Tabelle 4-9 Verwendete Hefestämme

Hefestamm	Genotyp	Generierungsmethode	Referenz
<b>W303-1A</b>	<i>MATa; ura3-1; ade2-1; trp1-1; his3-11,15; leu2-3,112</i>	Euroscarf	(Mortimer & Johnston 1986)
<b>W303-1A <math>\rho^0</math></b>	W303-1A,	Ethidiumbromid	diese Arbeit
<b>W303-1A <i>rim2</i><math>\Delta</math></b>	W303-1A, <i>rim2::natNT2</i> ;	PCR Fragment (pYM-N27) (Janke <i>et al.</i> 2004)	diese Arbeit
<b>W303-1A <i>mrs3</i><math>\Delta</math> <i>mrs4</i><math>\Delta</math></b>	W303-1A, <i>mrs3::HIS3</i> ; <i>mrs4::LEU2</i> ;	PCR Fragment (pFA6a-HIS3) (Euroscarf); (pUG73) (Gueldener <i>et al.</i> 2002)	diese Arbeit
<b>W303-1A <i>mrs3</i><math>\Delta</math> <i>mrs4</i><math>\Delta</math> <math>\rho^0</math></b>	W303-1A <i>mrs3</i> $\Delta$ <i>mrs4</i> $\Delta$ , $\rho^0$	Ethidiumbromid	diese Arbeit
<b>W303-1A <i>mrs3</i><math>\Delta</math> <i>mrs4</i><math>\Delta</math> <i>rim2</i><math>\Delta</math></b>	W303-1A <i>mrs3</i> $\Delta$ <i>mrs4</i> $\Delta$ , <i>rim2::natNT2</i> ;	PCR Fragment (pYM-N27) (Janke <i>et al.</i> 2004)	diese Arbeit
<b>W303-1A <i>mrs4</i><math>\Delta</math></b>	W303-1A, <i>mrs4::HIS3</i> ;	PCR Fragment (pFA6a-HIS3) (Euroscarf)	diese Arbeit
<b>W303-1A <i>mrs4</i><math>\Delta</math> <i>rim2</i><math>\Delta</math></b>	W303-1A <i>rim2</i> , <i>mrs4::HIS3</i> ;	PCR Fragment (pFA6a-HIS3) (Euroscarf) PCR Fragment (pYM-N27)	diese Arbeit
<b>BY4742</b>	<i>MATa; his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0</i>	Euroscarf	(Brachmann <i>et al.</i> 1998)
<b>BY4742 <i>trp1</i><math>\Delta</math></b>	<i>MATa; his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0</i> <i>YDR007w (TRP1)::kanMX4</i>	PCR Fragment (pFA6a-kanMX4)	diese Arbeit
<b>BY4742 <i>trp1</i><math>\Delta</math> <math>\rho^0</math></b>	BY4742 <i>trp1</i> $\Delta$ , $\rho^0$	Ethidiumbromid	diese Arbeit
<b>BY4742 <i>trp1</i><math>\Delta</math> <i>mrs3</i><math>\Delta</math> <i>mrs4</i><math>\Delta</math></b>	BY4742 <i>trp1</i> $\Delta$ , <i>mrs4::LEU2</i> <i>mrs3::HIS3</i>	PCR Fragment (pFA6a-HIS3) (Euroscarf); (pUG73)(Gueldener <i>et al.</i> 2002)	diese Arbeit
<b>BY4742 <i>trp1</i><math>\Delta</math> <i>mrs3</i><math>\Delta</math> <i>mrs4</i><math>\Delta</math> <math>\rho^0</math></b>	BY4742 <i>trp1</i> $\Delta$ <i>mrs4</i> $\Delta$ <i>mrs3</i> $\Delta$ , $\rho^0$	Ethidiumbromid	diese Arbeit
<b>BY4742 <i>trp1</i><math>\Delta</math> <i>mrs3</i><math>\Delta</math> <i>mrs4</i><math>\Delta</math> <i>rim2</i><math>\Delta</math></b>	BY4742 <i>trp1</i> $\Delta$ <i>mrs4</i> $\Delta$ <i>mrs3</i> $\Delta$ , <i>rim2::natNT2</i> ;	PCR Fragment (pFA6a-natNT2) (Janke <i>et al.</i> 2004)	diese Arbeit
<b>BY4742 <i>trp1</i><math>\Delta</math> <i>rim2</i><math>\Delta</math></b>	BY4742 <i>trp1</i> $\Delta$ , <i>rim2::natNT2</i> ;	PCR Fragment (pYM-N27)	diese Arbeit

		(Janke <i>et al.</i> 2004)	
<b>yap5Δ</b>	W303-1A, <i>yap5::natNT2</i>	PCR Fragment (pFA6a–natNT2)(Janke <i>et al.</i> 2004)	diese Arbeit
<b>Gal-ISU1/isu2Δ</b>	W303-1A, <i>pISU1::GAL1-10-HIS3</i> , <i>isu2::LEU2</i>	PCR Fragment (pFA6a-HIS3-Gal, pUG73) (Gueldener <i>et al.</i> 2002)	(Muhlenhoff <i>et al.</i> 2003a)
<b>Gal-YAH1</b>	W303-1A, <i>pYAH1::GAL1-10-LEU2</i>	PCR Fragment (pTL26)	(Lange <i>et al.</i> 2000)
<b>Gal-NFS1</b>	W303-1A, <i>pNFS1::GAL1-10-HIS3</i>	PCR Fragment (pFA6a-HIS3-Gal)	(Muhlenhoff <i>et al.</i> 2003a)
<b>Gal-SSQ1</b>	W303-1A, <i>pSSQ1::GAL1-10-HIS3</i>	PCR Fragment (pFA6a-HIS3-Gal)	(Muhlenhoff <i>et al.</i> 2003a)
<b>Gal-GRX5</b>	W303-1A, <i>pGRX5::GAL1-10-HIS3</i>	PCR Fragment (pFA6a-HIS3-Gal)	(Muhlenhoff <i>et al.</i> 2003a)
<b>Gal-ATM1</b>	W303-1A, <i>pATM11::GAL-L-natNT2</i>	PCR Fragment (pYM-N27) (Janke <i>et al.</i> 2004)	Dr. Srinivasan
<b>Gal-GRX4/grx3Δ</b>	W303-1A, <i>pGRX5::GAL1-10-HIS3</i>	PCR Fragment (pFA6a-HIS3-Gal)	(Muhlenhoff <i>et al.</i> 2003a)
<b>Gal-DRE2</b>	W303-1A, <i>pDRE2::GAL1-10-natNT2</i>	PCR Fragment (pYM-N23) (Janke <i>et al.</i> 2004)	(Bernard <i>et al.</i> 2013)
<b>Gal-CFD1</b>	W303-1A, <i>pCFD1::GAL1-10-HIS3</i>	PCR Fragment (pFA6a-HIS3-Gal)	(Balk <i>et al.</i> 2004)
<b>Gal-NBP35</b>	W303-1A, <i>pNBP35::GAL1-10-HIS3</i>	PCR Fragment (pFA6a-HIS3-Gal)	(Hausmann <i>et al.</i> 2005)
<b>Gal-NAR1</b>	W303-1A, <i>pNAR1::GAL1-10-HIS3</i>	PCR Fragment (pFA6a-HIS3-Gal)	(Balk <i>et al.</i> 2004)
<b>Gal-MET18</b>	W303-1A, <i>pMET18::GAL1-10-GFP-3-natNT2</i>	PCR Fragment (pYM-N25) (Janke <i>et al.</i> 2004)	(Stehling <i>et al.</i> 2012)

#### 4.2.6 Bakterienstämme

In dieser Arbeit fanden folgende *E.coli* Stämme Verwendung:

Tabelle 4-10 Verwendete Bakterienstämme

<b><i>E. coli</i> Stamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Referenz</b>
<i>DH5α</i>	<i>F</i> - $\phi$ 80d/ <i>lacZΔM15 Δ(lacZYAargF)</i> U169 <i>recA1 endA1 hsdR17(rk –mk +) phoA</i> <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ</i> -	Klonierung	
<i>C41</i> (DE3)	<i>F</i> <sup>–</sup> <i>ompT gal dcm hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>–</sup> m<sub>B</sub><sup>–</sup>)</i> (DE3)	Expression rekombinanter Proteine	(Miroux & Walker 1996)

## 4.3 Molekularbiologische Methoden

### 4.3.1 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) dient der *in vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotiden (*Primer*) (Mullis & Faloona 1987). Der PCR-Reaktionsansatz wurde auf Eis pipettiert. Für ein Reaktionsgemisch wurde im entsprechenden Puffer 250 µM dNTP-Mix (Peglab), 500 nM forward-Oligonukleotide, 500 nM reverse-Oligonukleotide, ca. 500 ng Template-DNA sowie 2 U *Tag* (*Thermus aquaticus*; Thermo Scientific) oder *Phusion*<sup>®</sup>-Polymerase (Finnzymes) eingesetzt. Eine PCR basiert auf drei sich wiederholenden Schritten: Erstens Denaturierung der Ausgangs-DNA (95 – 98 °C), zweitens Anlagerung (*annealing*) der Oligonukleotide an die Ausgangs-DNA (50 – 60 °C, je nach Schmelztemperatur der Oligonukleotide) und drittens Extension (*elongation*) durch die DNA-Polymerase. Optimierungen (Zyklenzahl, Elongationszeit, Annealing-temperatur, Reaktionspuffer, DMSO-Zugabe) wurden nach Herstellerangaben vorgenommen. Die Amplifikation der DNA wurde anschließend mittels der Agarosegelelektrophorese (s. 4.3.4) kontrolliert.

### 4.3.2 *In vitro* Mutagenese durch PCR-Reaktion

Für die Einführung spezifischer Mutationen in Gene wurde eine modifizierte Version der Quik-Change-Methode angewandt (Zheng *et al.* 2004). Dabei wurden teilkomplementäre Oligonukleotide, die sechs Basen vor ihrem 5'-Ende die gewünschte Mutation enthalten und mindestens einen 15 Basen langen 3'-Überhang aufweisen, verwendet. Die weitere Durchführung der PCR erfolgte standardmäßig unter Verwendung der *Phusion*<sup>®</sup> DNA-Polymerase, gefolgt von einer Überprüfung der PCR-Reaktion mittels analytischer Agarosegel-elektrophores (s. 4.3.4).

### 4.3.3 Reinigung von DNA

Zur Trennung von DNA und Kontaminationen (z. B. Agarose, Enzyme, Oligonukleotide oder Nukleotide) wurde das NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II Kit der Firma Macherey & Nagel nach Herstellerangaben verwendet. Die Reinigung basiert wiederum auf der Bindung von DNA an Silikat-Membranen in Gegenwart chaotroper Reagenzien (Vogelstein & Gillespie 1979). Eluiert wurde je nach Bedarf mit 15 – 50 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,5.



#### 4.3.4 Agarosegelelektrophorese

Zur Größenauftrennung von DNA-Fragmenten wurde 1 - 2 % (w/v) Agarosegele und als Laufpuffer TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 0,01 % (v/v) Essigsäure) verwendet (Sambrook & Russel 2001). Der Ladepuffer war *BlueJuice™ Gel Loading Buffer* (10x bestehend aus: 65 % (w/v) Saccharose; 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,3 % (w/v) Bromphenolblau). Gefärbt wurde die DNA durch Zugabe von *GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain* der Firma Biotium zu jeder DNA-Probe. Die Visualisierung erfolgte im Anschluss an die Elektrophorese mit Hilfe des GDS Systems der Firma Intas oder eines UV-Schirms. Durch Vergleich mit dem Größenstandard *GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder* (Fermentas) konnte auch die DNA-Konzentration einer Probe abgeschätzt werden.

#### 4.3.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Für die Präparation von Plasmid-DNA wurden 5 ml LB-Medium (versehen mit den entsprechenden Antibiotika) mit einer einzelnen Kolonie transformierter Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Isolierung der DNA erfolgte unter Verwendung des Kits *NucleoSpin Plasmid DNA Purification* (Machery-Nagel), entsprechend den Angaben des Herstellers (Birnboim & Doly 1979).

#### 4.3.6 Analytischer Restriktionsverdau

Für die hydrolytische Spaltung von DNA wurden Typ II Restriktions-endonukleasen (Fermentas und New England Biolabs) verwendet. Die Reaktionsbedingungen richteten sich dabei nach den Angaben des entsprechenden Herstellers. Nach einer 2-stündigen Inkubation bei 37 °C wurden die Proben anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen (s. 4.3.4).

#### 4.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) wurde für die Ligation von Insert- und Vektor-DNA eingesetzt. Ein Standardligationsansatz erfolgte in 10 µl Gesamtvolumen (25 – 50 ng Vektor-DNA und die fünffache Stoffmenge Insert-DNA; 1 µl 10x Ligase-Puffer, 0,5 µl T4-Ligase) und wurde 2 h bei RT oder 16 h bei 12 °C inkubiert.

#### 4.4 Zellbiologische Methoden

Alle im Rahmen dieser Arbeit mit gentechnisch veränderten Organismen durchgeführten Experimente wurden gemäß aktuellem Gentechnikgesetz (GenTG) durchgeführt und fielen unter die Sicherheitsstufe S1. Mit biologischem Material kontaminierte Lösungen und Gefäße wurden 20 min bei 121 °C und einem Druck von 1,5 bar inaktiviert.

##### 4.4.1 Kultivierung von Hefestämme

Hefezellen wurden in YP-Medium (1 % [w/v] Hefeextrakt; 2 % [w/v] Pepton), versetzt mit 2 % (w/v) Glucose (YPD), 3 % (w/v) Galactose (YPG) oder 3 % (w/v) Glycerin (YPGly) als Kohlenhydratquelle, angezogen. Zur Herstellung von festen Nährböden wurde zusätzlich zum YP-Medium 2,5 % Agar hinzugefügt. Synthetisches Minimalmedium basierte auf „*Yeast Nitrogen Base without Amino Acids & Ammonium Sulphate*“ (1,9 g/l; Formedium LTD) und Ammonium Sulphate (5 g/l; Roth) und wurde ergänzt um die Markersubstanzen und eine Kohlenstoffquelle (Sherman 2002). Da die verwendeten Hefen verschiedene Auxotrophien für Adenin, Uracil, Leucin, Tryptophan und Histidin besaßen, wurden diese Markersubstanzen nach Bedarf zusätzlich zugegeben. Des Weiteren wurde das Synthetische Minimalmedium (SC) durch den Zusatz des Additivmixes (*Drop out mix*) vervollständigt.

##### Drop out mix:

Adenin 4 g/l; L-Arginin 1 g/l; L-Aspartat 5 g/l; L-Asparagin 0,5 g/l; L-Glutamat 20 g/l; L-Isoleucin 1,5 g/l; L-Lysin 1,5 g/l; L-Methionin 1 g/l; L-Phenylalanin 2,5 g/l; L-Serin 20 g/l; L-Threonin 10 g/l; L-Tyrosin 1,5 g/l; L-Valin 0,6 g/l)

##### 4.4.2 Herstellung von *rho*<sup>0</sup> Zellen

Ein Verlust der mitochondrialen DNA (*rho*<sup>0</sup>) in Hefezellen wurde induziert durch das Wachstum auf YPD oder SD Agarplatten mit Ethidiumbromid (Fox *et al.* 1991).

##### 4.4.3 Transformation von Hefezellen

Die Transformation von *S. cerevisiae* Zellen wurde nach der Lithiumacetat-Methode (Ito *et al.* 1983) durchgeführt und diente zur Einführung von Plasmid-DNA oder linearer DNA-Fragmente für homologe Rekombination. Hierzu wurden Übernachtskulturen der zu transformierenden Hefezellen in 25 - 50 ml YPD bzw. SD Medium auf eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,25 verdünnt und bei 30 °C und 150 rpm bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von

ca. 0,7 - 0,8 inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 2500  $xg$  für 5 min geerntet, einmal mit 1 ml Aqua bidest und ein weiteres Mal mit LiAc-Puffer (100 mM LiOAc; 10 mM Tris/HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA) gewaschen. Im Anschluss wurde das Zellpellet in LiAc-Puffer aufgenommen, 100  $\mu$ l dieser Zellsuspension wurde mit 5  $\mu$ g der zu transformierenden DNA, zusammen mit 100  $\mu$ g Träger-DNA (Lachssperma-DNA, 5 min bei 95 °C denaturiert) versetzt, für 30 min bei 30 °C unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend nach Zugabe von 700  $\mu$ l PEG-Lösung (LiAc-Puffer mit 40 % (w/v) PEG 4000) für 25 min bei 42 °C hitzegeschockt. Nach 5 min Zentrifugation bei 4000  $xg$  wurde das Pellet gewaschen, erneut zentrifugiert und in 100  $\mu$ l sterilen Aqua bidest resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf selektiven SC-Nährböden ausgestrichen und bei 30 °C inkubiert. Nach 3-4 Tagen wurden Einzelkolonien gepickt und mindestens zweimal neu ausgestrichen.

#### 4.4.4 Dauerkulturen von *S. cerevisiae*

Die Lagerung von *S. cerevisiae* Stämmen erfolgte in einer 15 %-igen Glycerin-YPD/Gal- oder SD/Gal-Lösung bei -80 °C.

#### 4.4.5 Hefezelllysats mittels alkalischer Lyse

Zur Herstellung eines Zelllysats wurde 1 ml Hefekultur mit einer  $OD_{600}$  von 2,0 in einem Eppendorfreaktionsgefäß pelletiert (5 min, 4600  $xg$ ), in 500  $\mu$ l TE-Puffer gewaschen (10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA), und anschließend in 500  $\mu$ l  $dH_2O$  resuspendiert. Es wurde 75  $\mu$ l Lyse-Puffer (1,85 M NaOH; 7,4 % (v/v) 2-Mercaptoethanol; 10 mM PMSF) zugegeben, auf dem Vortexer geschüttelt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 575  $\mu$ l 50% TCA-Lösung, einer Inkubation von 10 min auf Eis und der Zentrifugation bei 13000  $xg$  für 10 min bei 4 °C wurde das Pellet zweimal in eiskaltem Aceton gewaschen, getrocknet und anschließend in 60  $\mu$ l 1x Laemmli-Puffer (s. 4.6.3) aufgenommen.

#### 4.4.6 Präparation von Hefegesamtzellextrakt mittels Glasperlen

Hefezellen können bei größeren Mengen mechanisch durch kräftiges Vortexen mit Glasperlen (Durchmesser: 0,75 - 1 mm, Roth) lysiert werden (Woontner & Jaehning 1990). Dazu wurden 0,5 g Hefezellen, nach dem Waschen mit 10 ml  $dH_2O$  in 0,5 ml TENTG-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 2,5 mM EDTA; 10 % (v/v) Glycerol; 0,5 % (v/v) Triton X-100) resuspendiert und mit 10  $\mu$ l 200 mM PMSF und 1-

fach Protease-Inhibitor versetzt. Ungefähr ein halbes Volumen Glasperlen wurde zugegeben und dreimal für eine Minute bei höchster Geschwindigkeit kopfüber auf dem Vortexer geschüttelt. In den Pausen zwischen den drei Vortexschritten wurde die Probe auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 2500  $\times g$ , 4 °C) wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und erneut zentrifugiert (10 min, 13000  $\times g$ , 4 °C). Der Überstand dieser Zentrifugation stellte das Gesamtzellextrakt dar.

#### 4.4.7 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB-Medium (Trypton 10 g/l; Hefeextrakt 5 g/l; NaCl 10 g/l) (Sambrook & Russel 2001), welches aus Selektionsgründen teils mit Ampicillin (100  $\mu\text{g/ml}$ ) supplementiert wurde. Die hier verwendeten *E. coli* Kulturen wurden bei 37 °C inkubiert.

#### 4.4.8 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte nach der Calciumchlorid-Methode (Dagert & Ehrlich 1979). Dabei wurden 100 ml LB-Medium mit Zellen einer Vorkultur inokuliert, sodass eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,1 vorlag. Diese Kultur wurde bei 37 °C bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,5 schüttelnd (150 rpm) und anschließend für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 2800  $\times g$ , 4 °C) und Aufnahme der Zellen in 25 ml einer eiskalten 50 mM Calciumchlorid-Lösung, folgte eine weitere 15-minütige Inkubation auf Eis. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 2800  $\times g$ , 4 °C) wurden die Zellen in 4 ml 50 mM  $\text{CaCl}_2$  mit 15 % (w/v) Glycerol resuspendiert. Jeweils 100  $\mu\text{l}$  der Zellen wurden in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### 4.4.9 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Zu 100  $\mu\text{l}$  kompetenter *E. coli* Zellsuspension wurde Plasmid DNA (25 - 100 ng) oder 10  $\mu\text{l}$  eines Ligationsansatzes gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte eine Inkubation bei 42 °C für 90 Sekunden („Hitzeschock“). Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurde zu den Zellen 1 ml LB-Medium gegeben und die Kultur bei 37°C für 1 Stunde inkubiert. Durch Zentrifugation (1 min, 13000  $\times g$ ) wurden die Zellen sedimentiert und 900  $\mu\text{l}$  des Überstands verworfen. In den verbliebenen 100  $\mu\text{l}$  Überstand wurden die Zellen resuspendiert und auf eine LB-Amp<sup>R</sup>-Agarplatte ausgestrichen. Die Agarplatte wurde bei 37 °C für 16 h inkubiert.

## 4.5 Biochemische Methoden

### 4.5.1 Kopplung von Antikörpern an Protein A Sepharose

Zur Kopplung der FC-Region von Antikörpern an Protein A (ursprünglich aus *Staphylococcus aureus* isolierte) wurde TENTG-Puffer verwendet. 50 mg Protein A SepharoseR (GE Healthcare) wurde in 500 µl Puffer für 1 h auf Eis inkubiert. Nach dem Pelletieren (5 min, 1200 xg, 4 °C) wurde 500 µl des gewünschten Antikörperserums zugegeben und 2 h bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Nach Pelletieren wie zuvor und fünfmaligem Waschen mit 500 µl Puffer wurden die gekoppelten Mikropartikel („Immunobeads“) in 500 µl Puffer aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

### 4.5.2 (Co-)Immunpräzipitation (CoIP)

Die Methode der Co-Immunpräzipitation dient dem Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* und wird zur Verifizierung von Ergebnissen verwendet, die durch andere Techniken erhalten wurden (Berggard *et al.* 2007). Sofern nicht anders angegeben wurde für die CoIP je 250 µl eines Gesamtzellextraktes (s. 4.4.6) mit 20 – 40 µl Immunobeads (s. 4.5.1) resuspendiert und rotierend für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Nach Pelletieren (5 min, 1200 xg, 4 °C) und ein- bis dreimaligem Waschen mit 500 µl Puffer wurden die Immunobeads in 60 µl 1x Laemmli-Puffer (s. 4.6.3) aufgenommen und 5 min bei 95 °C denaturiert.

### 4.5.3 Bestimmung der *de novo* Fe/S-Cluster Synthese in *S. cerevisiae*

Eine 25 ml Vorkultur in SD oder SGal Medium wurde durch Zentrifugation (5 min, 2800 xg, RT) pelletiert, einmal mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und zu einer OD<sub>600</sub> von 0,2 in 100 – 200 ml „Eisen-freies“ Minimalmedium für 16 h bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert (5 min, 2500 xg, RT), mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und 0,5 g Zellen wurden in 10 ml „Eisen-freies“ Minimalmedium überführt. Nach 10 min Inkubation bei 30°C wurde 10 µCi <sup>55</sup>FeCl<sub>3</sub> (Perkin Elmer) in 100 mM Natriumascorbat zugegeben und für 2 h inkubiert. Die radioaktiv markierten Zellen wurden in einem 15 ml Falcon-Reaktionsgefäß geerntet, erst mit 10 ml Citrat-Puffer (50 mM Na-Citrat, 1 mM EDTA, pH 7,0), dann mit 1 ml HEPES/KOH (20 mM HEPES, pH 7,0) gewaschen und anschließend in 500 µl TENTG-Puffer resuspendiert. Nach der Herstellung eines Gesamtzellextrakts mittels Glasperlen (s. 4.4.6) wurde aus diesem das gewünschte Protein immunpräzipitiert (s. 4.5.2). Die co-präzipitierte <sup>55</sup>Fe-Radioaktivität wurde durch Szintil-

lationszählung quantifiziert und als direktes Maß für den *de novo* Fe/S-Cluster Einbau in das präzipitierte Protein verwendet (Kispal *et al.* 1999, Molik *et al.* 2007).

#### 4.5.4 Bestimmung der *de novo* Häm-Synthese in *S. cerevisiae*

Eine 25 ml Vorkultur in SD oder SGal Medium wurde durch Zentrifugation (5 min, 2800 xg, RT) pelletiert, einmal mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und zu einer OD<sub>600</sub> von 0,2 in 100 – 200 ml „Eisen-freies“ Minimalmedium für 16 h bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert (5 min, 2500 xg, RT), mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und 0,5 g Zellen wurden in 10 ml „Eisen-freies“ Minimalmedium überführt. Nach 10 min Inkubation bei 30 °C wurde 10 µCi <sup>55</sup>FeCl<sub>3</sub> (Perkin Elmer) in 100 mM Natriumascorbat zugegeben und für 2 h inkubiert. Je 0,25 g der radioaktiv markierten Zellen wurden in einem 15 ml Falcon-Reaktionsgefäß geerntet, mit 10 ml Citrat-Puffer (50 mM Na-Citrat, 1 mM EDTA, pH 7,0) gewaschen und anschließend in 500 µl dH<sub>2</sub>O resuspendiert. Zusätzlich wurden 25 µl Stopplösung (100 mM FeCl<sub>3</sub> in 5 M HCl) und 800 µl Butylacetat hinzugegeben. Nach der Herstellung eines Gesamtzellextrakt mittels Glasperlen (s. 4.4.6) wurde die Lösung durch Zentrifugation (10 min, 12000 xg, RT) in eine organische und anorganische Phase getrennt. 250 µl der organischen Phase wurde durch Szintillationszählung quantifiziert und als direktes Maß für den *de novo* Häm-Synthese verwendet.

#### 4.5.5 Messung der Aconitase-Enzymaktivität

Aconitase (Aco1) als mitochondriales Enzym des Citratzyklus bindet einen [4Fe-4S]-Cluster als Cofaktor. Ein gekoppelter Enzymtest diente der indirekten Bestimmung der Aconitase-Aktivität (Kispal *et al.* 1997).

Puffer:	50 mM Triethanolamin pH8,0; 50 mM NaCl; 1,5 mM MgCl <sub>2</sub>
Lösungen:	20 mM Cis-Aconitat
	40 mU/µl Isocitratdehydrogenase (IDH)
Probenküvette:	10 – 20 µl Gesamtzellextrakt (s. 4.4.6)
	950 µl Puffer
	12 µl Cis-Aconitat
	10 µl IDH
Referenzküvette:	10 – 20 µl Gesamtzellextrakt (s. 4.4.6)
	950 µl Puffer

## 12 µl Cis-Aconitat

Der Umsatz des IDH Co-Substrates NADP<sup>+</sup> wurde bei 340 nm ( $\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) bestimmt. Unspezifische NADP<sup>+</sup>-Reduktion wurde durch Messung gegen eine Referenzprobe subtrahiert (Gelling *et al.* 2008).

**4.5.6 Messung der Catalase-Enzymaktivität**

Die cytosolisch lokalisierte Catalase trägt einen Häm-Cofaktor und katalysiert die Disproportionierung von Wasserstoffperoxid. Der enzymatische Umsatz kann über die Absorption von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei 240 nm ( $\epsilon_{240} = 3890 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) gemessen werden.

Puffer:	50 mM MES pH 6,5; 50 mM NaCl
Lösungen:	3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Probenküvette:	10 – 20 µl Gesamtzellextrakt (s. 4.4.6)
	970 µl Puffer
	25 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

**4.5.7 Messung der Malat-Dehydrogenase-Aktivität**

Die Malat-Dehydrogenase (MDH) katalysiert die Umwandlung von Oxalacetat zu Malat unter Verbrauch von NADH (Heyde & Ainsworth 1968). Die Oxidation von NADH kann bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen werden ( $\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Kispal *et al.* 1997).

Puffer:	50 mM TRIS/SO <sub>4</sub> pH 7,4; 100 mM NaCl
Lösungen:	10 mg/ml NADH; 5 mg/ml Oxalacetat in TRIS/SO <sub>4</sub> pH 7,4
Probenküvette:	10 – 20 µl Gesamtzellextrakt (s. 4.4.6)
	970 µl Puffer
	20 µl NADH
	10 µl Oxalacetat
Referenzküvette:	10 – 20 µl Gesamtzellextrakt (s. 4.4.6)
	970 µl Puffer
	20 µl NADH

#### 4.5.8 Bestimmung der Luciferase-Aktivität

Hefezellen wurden mit einem LUX-Plasmid (s. Tabelle 4-8) transformiert und für 12 h in SD-Medium, supplementiert mit 1 mM  $\text{FeCl}_2$  (gelöst in 1 mM Natrium-Ascorbat) kultiviert. Der Zellaufschluss und die Bestimmung der Luciferase-Aktivität erfolgt mit dem Kit „Luciferase Assay System“ (Promega) nach Angaben des Herstellers. Für die Messung wurde allerdings ein leicht modifizierter Zellaufschluss-Puffer (25 mM TRIS/ $\text{PO}_4$  pH 7,8; 2 mM EDTA; 2 mM DTT; 10 % Glycerin; 0,1 % Triton X-100) verwendet. Dieser Puffer erlaubt eine Proteinbestimmung mittels Bradford-Lösung (Quick Start™ 1x Dye Reagent; Rotiquant [Roth]). Sowohl die Aktivitäts- als auch die Proteinbestimmung erfolgte im Lesegerät InfiniteR M200 (Tecan) unter Verwendung von geeigneten 96-well Platten.

### 4.6 Proteinbiochemische Methoden

#### 4.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration einer Proteinlösung kann mittels Bradford bestimmt werden. Dabei wurden zu 100  $\mu\text{l}$  Probenlösung 900  $\mu\text{l}$  Farbstofflösung (Rotiquant [Roth], 1:5 verdünnt) gegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde anschließend die Absorption bei 595 nm gemessen. Eine Eichkurve zur Quantifizierung wurde mit Hilfe eines Proteinstandards (BSA, 2 mg/ml) erstellt.

#### 4.6.2 Trichloressigsäure-Fällung (TCA-Fällung)

Zur Ausfällung oder Aufkonzentrierung von Proteinen aus einer Lösung wurde zu 100-200  $\mu\text{g}$  Probe 200  $\mu\text{l}$  40 % (w/v) TCA-Lösung hinzugegeben, gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 13000  $\times g$  für 10 min bei 4 °C wurde das Proteinpellet mit 500  $\mu\text{l}$  eiskalten Aceton zweimal gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und zum Schluss in 60  $\mu\text{l}$  1x Laemmli-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 5 % (w/v) Glycerol; 2 % (w/v) SDS; 0,05 mg/ml Bromphenolblau, 2,5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol) aufgenommen.



#### 4.6.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Größenauftrennung von Proteinen erfolgte durch diskontinuierliche vertikale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Dabei wurden zwei verschiedene Elektrophoresesysteme verwendet, zum einem große Gele (Eigenbau: Trenngel 10 x 15 x 0,1 cm; Sammelgel 2 x 15 x 0,1 cm) und zum anderem Minigele (Mini-PROTEAN II, BioRad; Trenngel 7 x 7,2 x 0,075 cm; Sammelgel 1 x 7,2 x 0,075 cm). Je nach Größe der zu trennenden Proteine wurde eine Acrylamidkonzentration im Trenngel von 15 %, 12,5 % oder 10 % gewählt. Zur Polymerisierung des Trenngels (14 %, 12,5 % bzw. 10 % [w/v] Acrylamid; 0,11 % [w/v] Bisacrylamid; 375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1 % [w/v] SDS) und des Sammelgels (5 % [w/v] Acrylamid; 0,033 % [w/v] Bisacrylamid; 60 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,1 % [w/v] SDS) wurden 0,05 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS) und 0,05 % [v/v] TEMED (Endkonzentrationen) hinzugegeben. Die zu analysierenden Proben wurden in Laemmli-Puffer (s. 4.6.2) aufgenommen, 5 min geschüttelt, 5 min auf 95 °C erhitzt und erneut 5 min geschüttelt, um sie im Anschluss auf das Gel aufzutragen. Die Elektrophorese erfolgte 3 - 4 h bei 30 mA (große Gele) oder 1,5 h bei 20 mA (Minigele) in SDS-Laufpuffer (0,1 % [w/v] SDS; 200 mM Glycin; 50 mM Tris).

#### 4.6.4 Färben von Proteinen mit Coomassie Brilliant-Blue

Die Methode der *Coomassie*-Färbung von SDS-PAGE Gelen erlaubt die Färbung der Proteine im Gel entsprechend ihrer Konzentration (Bennett & Scott 1971). Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die SDS-Gele 30 – 60 min in Färbelösung (5 % (v/v) Essigsäure; 50 % (v/v) Ethanol; 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250) geschwenkt. Das Gel wurde aus der Färbelösung entnommen und für 25 min in heißer Entfärbelösung (5 % (v/v) Essigsäure; 30 % (v/v) Ethanol) entfärbt. Die Hintergrundfärbung wurde durch Schwenken in Wasser (>2 h) verringert. Zur Dokumentation wurde das GDS System von Intas verwendet.

#### 4.6.5 Western Blot

Zum Transfer von gelelektrophoretisch getrennten Proteinen wurde das „semi dry blot“-Verfahren auf Nitrocellulose-Membranen verwendet. Hierzu wurde die Membran zusammen mit dem Chromatographiepapier in Transferpuffer (25 mM Tris-Base, 200 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 0,02 % (w/v) SDS) äquilibriert. Die Blotkammer wurde von unten (Pluspol) nach oben (Minuspol) wie folgt beschichtet: 2 Lagen Chromatographiepapier, Nitrocellulose-Membran, Gel und 2 Lagen Chromatographiepapier. Für den Transfer wurde bei großen Gelen 240 mA und bei

Minigelen 120 mA (entspricht ca. 2 mA/cm<sup>2</sup>) gewählt. Nach dem Transfer wurde die Membran mit Ponceau S Lösung (0,2 % (w/v) Ponceau S in 3 % (w/v) TCA) für 2 min gefärbt.

#### 4.6.6 Immundetektion von Proteinen

Die transferierte Nitrocellulose-Membran wurde zur Blockierung von unspezifischen Bindestellen für 1 h in 5 % Milchpulver in TBST-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Tween 20) geschwenkt. Nach einmaligem kurzem Waschen in TBST-Puffer wurde die Membran für 1,5 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in Primärantikörperlösung inkubiert. Nach der ersten Inkubation wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBST-Puffer gewaschen und im Anschluss mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper, verdünnt 1:10000 in TBST-Puffer mit 5 % (w/v) Milchpulver, für eine weitere Stunde inkubiert. Nachdem die Membran erneut dreimal gewaschen wurde, wurde das an die Membran gebundene HRP-Konjugat mit Hilfe der ECL-Detektionslösung (GE Healthcare) und dem Chemostar professional System (Intas) visualisiert.

Verwendet wurden folgende Antikörper:

**Tabelle 4-11 Verwendete Primärantikörper**

Primärantikörper	Hersteller
$\alpha$ -HA	Santa Cruz
$\alpha$ -Myc	Santa Cruz
$\alpha$ -Rim2	Zur Verfügung gestellt von Prof. Palmieri

Weitere Antiseren wurden aus Kaninchen durch Immunisierung mit rekombinantem Protein gewonnen. Für die Herstellung des Yap5-Antikörpers wurde die verkürzte Version von Yap5 als rekombinantes Protein verwendet. Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper wurden von der Firma BioRad bezogen.

#### 4.6.7 Heterologe Genexpression von rekombinantem Yap5

Die rekombinante Überexpression der YAP5-Konstrukte erfolgte in Zellen des *E. coli* Stamms C41 (DE3). Jeweils 2 l LB-Medium (mit 0,1 mg/ml Ampicillin) im 5 Liter-Erlenmeyerkolben wurden mit 75 ml einer Vorkultur inokuliert und bei 37 °C inkubiert. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 wurde mit 1 mM Isopropylthiogalaktosid (IPTG) induziert und zusätzlich 50  $\mu$ M Eisenammoniumcitrat zugesetzt. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine Probe „vor Induktion“ entnommen. Die Induktion erfolgte bei 28 °C über

Nacht. Anschließend wurde eine Probe „nach Induktion“ entnommen und die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 3500 xg) pelletiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei 80 °C gelagert.

#### 4.6.8 Präparativer Zellaufschluss von *E. coli*

Aerober Zellaufschluss: Das *E. coli* Zellpellet (s. 4.6.7) wurde im Aufschlusspuffer (5 % (v/v) Glycerin; 300 mM NaCl; 40 mM KPi; pH 7,8) aufgenommen, mit Protease-Inhibitor-Mix (50x, Firma Roche) sowie 1 mM PMSF und Antifoam versetzt. Nach 20-minütiger Inkubation bei 4 °C wurde die Zellen anschließend in drei Durchläufen in dem Gerät EmulsiFlexR C3 (Avestin) aufgeschlossen. Zum Abbau von DNA wurde eine Spatelspitze DNaseI zugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen wurden durch Zentrifugation (2 h, 50000 xg, 4 °C) entfernt.

Anaerober Zellaufschluss: Das *E. coli* Zellpellet (s. 4.6.7) wurde in die Anaerobenkammer eingeschleust und in anaeroben Aufschlusspuffer (5 % (v/v) Glycerin; 300 mM NaCl; 40 mM KPi; pH 7,8) aufgenommen, mit Protease-Inhibitor-Mix (50x, Firma Roche) sowie 1 mM PMSF und Antifoam versetzt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte in 3 – 5 Durchläufe mittels des Ultraschallgeräts Sonopuls (Bandelin) innerhalb der Anaerobenkammer. Zelltrümmer und nicht aufgeschlossenen Zellen wurden durch Zentrifugation (2 h, 50000 xg, 4 °C) in verschließbaren, Sauerstoffdichten Zentrifugenröhrchen entfernt.

#### 4.6.9 Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA

Bei der Affinitätschromatographie wurde das Lysat vom *E. coli* Zellaufschluss (s. 4.6.8) mit 2 mM Imidazol versetzt und anschließend über eine Säule mit Ni<sup>2+</sup>-Sepharose (GE Healthcare) gegeben. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen mit geringen Imidazolkonzentrationen (1. Waschschrift 10 mM Imidazol; 2. Waschschrift: 30 mM Imidazol) entfernt. Die Elution des an die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix gebundenen Proteins erfolgte durch kompetitives Verdrängen mit 250 mM Imidazol.

#### 4.6.10 Gelfiltrationschromatographie

Bei der Gelfiltrationschromatographie oder auch Größenausschlusschromatographie genannt werden Proteine nach ihrer Größe getrennt. Basierend auf einer Gelmatrix mit Poren definierter Größe, diffundieren Proteine in erster Näherung proportional zum

Logarithmus der molekularen Masse. Die Gelfiltration wurde sowohl präparativ zur Proteinreinigung (Äkta-System) als auch analytisch (HPLC) - nach Kalibration der Säule mit Standardproteinen zur Bestimmung des Molekulargewichts eingesetzt. Die vorgefertigten Säulen wurden jeweils unter Beachtung der vom Hersteller (GE Healthcare) angegebenen Spezifikationen verwendet. Im Einzelnen waren dies folgende Säulen: High Load Superdex 75 16/ 60, Flussrate 1 ml/min zur Proteinaufreinigung (Puffer: 40 mM KPi, pH 7,5; 150 mM NaCl; 5 % Glycerin) sowie für HPLC: Shodex HW 802.5, Flussrate 0,8 ml/min (Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 250 mM NaCl) für qualitative Analysen.

#### 4.6.11 Umpuffern von Proteinen

Entsalzungssäulen, bestehend aus Gelfiltrationsmaterial erlauben die Trennung hochmolekularer Spezies (>5000 Da) wie Proteinen von niedermolekularen Substanzen (<1000 Da) wie z. B. Tris, Imidazol oder Salzen. Des Weiteren können mit ihnen Proteine in Puffer (standardmäßig: 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl) gewünschter Zusammensetzung überführt werden. Es wurden PD-10 Entsalzungssäulen (GE Healthcare) mit Probenvolumen von 2,5 ml bzw. 200 µl nach Herstellerangaben verwendet.

#### 4.6.12 Konzentrierung von Proteinen

Die Aufkonzentrierung von tYap5-Proteinlösungen erfolgte durch Amicon Ultra-Konzentratoren (Millipore) mit einem Fassungsvermögen von 15 ml und einem Ausschlussvolumen von 10 kDa. Konzentriert wurde bei maximal 2800 xg in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C. Die Zentrifugation wurde nach kurzen Zeitintervallen unterbrochen und die Lösung durch Schwenken durchmischt, um einer Ausfällung des Proteins an der Membran vorzubeugen.

#### 4.6.13 Chemische Rekonstitution von Fe/S-Proteinen

Zur Rekonstitution des Fe/S-Clusters auf tYap5 wurde zum Ausschluss von Sauerstoff in der anaeroben Kammer gearbeitet. Es wurde im Verhältnis Proteinkonzentration zu 2, 4 oder 8-facher Eisen- und Schwefelkonzentration (1:2; 1:4 bzw. 1:8) rekonstituiert. Standardmäßig wurde 200 µM des gereinigten Proteins (in 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl) zuerst mit 5 mM DTT zwei Stunden lang auf Eis reduziert. Anschließend wurde für die Rekonstitution bei RT im Verhältnis 1:2 400 µM Eisen(III)ammoniumcitrat

( $\text{Fe}^{3+}$ ) hinzugegeben. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit und der Entstehung einer rot-rosa Farbe, wurde der Ansatz mit 400  $\mu\text{M}$  Lithiumsulfid ( $\text{S}^{2-}$ ) versetzt. Die Änderung der Farbe zu rötlich-braun wurde innerhalb eines Zeitraumes von 30 Minuten beobachtet. Zur Entfernung von überschüssigen Salzen, die mit der Zeit ausfallen könnten, wurde die Probe über eine PD-10 Säule (s. 4.6.11) entsalzt und mit Hilfe der Millipore (s. 4.6.12) aufkonzentriert.

#### 4.6.14 Bestimmung des Sulfidionengehalts

Der Gehalt säurelabile-Sulfidionen ( $\text{S}^{2-}$ ) von Fe/S-Proteinen wird kolorimetrisch durch die Reaktion von  $\text{S}^{2-}$  mit DMPD (N,N'-dimethyl-1,4-phenylendiamin) unter sauren und oxidierenden Bedingungen ( $\text{FeCl}_3$ ) durch die Bildung von Methylenblau detektiert. Je nach Konzentration der Probe wurde 30 - 100  $\mu\text{l}$  auf ein Endvolumen von 200  $\mu\text{l}$  eingesetzt. Des Weiteren wurden auf 200  $\mu\text{l}$  Endvolumen eine Sulfidstandardreihe (0, 5, 10, 20, 30, 40 und 50 nmol  $\text{Li}_2\text{S}$  gelöst in 10 mM NaOH) pipettiert. Nacheinander wurden die Proben mit 600  $\mu\text{l}$  1 % (w/v) Zinkacetat und 50  $\mu\text{l}$  7 % (w/v) NaOH versetzt. Die Proben wurden kurz invertiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das weiße Präzipitat wurde bei 7700  $\times g$  für 15 Sekunden pelletiert und durch langsames Hinzugeben und Vortexen von 150  $\mu\text{l}$  einer 0,1 % DMPD-Lösung (in 5 M HCl) wieder gelöst. Anschließend wurden 150  $\mu\text{l}$  einer 10 mM  $\text{FeCl}_2$ -Lösung (in 1 M HCl) hinzugegeben und 20 Sekunden gevortext. Die Proben wurden 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption des gebildeten Methylenblaus bei 670 nm gegen Wasser gemessen.

#### 4.6.15 Bestimmung des Eisenionengehalts

Die Methode beruht auf Metall-bindenden Chelatoren, die in der Lage sind, mit diesen im nanomolaren Bereich farbige Komplexe zu bilden (Beinert 1978). Je nach Konzentration der Probe wurde 10 - 40  $\mu\text{l}$  auf ein Endvolumen von 100  $\mu\text{l}$  eingesetzt. Des Weiteren wurden auf 100  $\mu\text{l}$  Endvolumen eine Eisenstandardreihe (0, 1, 2, 4, 10 und 20 nmol Mohr'sches Salz  $[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}]$ ) pipettiert. Mit dem Eisenstandard als auch parallel mit den Proben wurde wie folgt fortgefahren: 100  $\mu\text{l}$  1 % (w/v) Salzsäure (HCl), durch leichtes Schütteln gemischt wurde 10 min auf 80 °C inkubiert. Nach einer Abkühlungsphase wurden nacheinander 500  $\mu\text{l}$  7.5 % (w/v) Ammoniumacetat, 100  $\mu\text{l}$  4 % (w/v) Natrium-Ascorbinsäure, 100  $\mu\text{l}$  2.5 % (w/v) SDS sowie 100  $\mu\text{l}$  1.5 % (w/v) Feren (3-2(2-Pyridyl)-5,6-di(2-furyl)-1,2,4-Triazin-5',5''-Disulfonsäure, Eisenchelator) hinzugegeben. Nach der Zugabe der einzelnen Lösungen wurde stets gevortext. Nach

einer Zentrifugation (5 min, 7700 xg) wurde die Absorption bei 593 nm gegen Wasser gemessen.

#### 4.6.16 UV/VIS-Spektroskopie

Bei dieser Spektroskopiemethode werden Wellenlängen im Bereich des ultravioletten (UV) und des sichtbaren Lichtes (visible, VIS) verwendet. Fe/S-Cluster zeigen charakteristische Absorptionsmuster im UV/VIS-Spektrum. Zur Aufnahme eines Spektrums wurde die entsalzte Probe so verdünnt, dass die Absorption bei 280 nm zwischen 0,7 und 1,0 lag. Unter Verwendung von Quarzküvetten (Hellma Analytics) wurde die Absorptionsveränderung in einem Bereich zwischen 260 nm und 700 nm verfolgt. Ebenfalls wurde ein Spektrum des Puffers aufgezeichnet, um später aus diesem Differenzspektrum das Spektrum des Proteins zu berechnen.

#### 4.6.17 Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie)

Durch einen zum Modulator synchron geschaltetem Detektor wird die Differenz der Absorption von links- und recht-zirkular polarisiertem Licht gemessen und in die Elliptizität umgerechnet. Im UV-Bereich des Lichts können aus einem CD-Spektrum Informationen über Sekundärstrukturen von Proteinen oder Makromolekülen erhalten werden. Des Weiteren liefert es im VIS-Bereich auch über gebundene Cofaktoren Informationen. Zur Charakterisierung des Fe/S-Cofaktors wurde die Elliptizität in einem Bereich zwischen 300 nm und 700 nm in einer speziellen CD-tauglichen 1 mm-Quarzglas-Küvette (Hellma Analytics) verfolgt. Im Fall von tYap5 wurde 250 µl der rekonstituierten, aufkonzentrierten Probe unverdünnt gemessen. Ebenfalls wurde ein Spektrum des Puffers aufgezeichnet, um später aus diesem Differenzspektrum das Spektrum des Proteins zu berechnen.

#### 4.6.18 Probenvorbereitung für Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

Bei der *electron paramagnetic resonance*- (EPR) bzw. Elektronen-spinresonanz-Spektroskopie (ESR) wird die resonante Mikrowellenabsorption einer Probe in einem äußeren Magnetfeld gemessen. Die Mikrowellenleistung bleibt hierbei konstant, während die Änderungen der absorbierten Mikrowellenenergie in der Probe in Abhängigkeit der Magnetfeldstärke aufgezeichnet werden. Es können nur Substanzen mit einem oder mehreren ungepaarten Elektronen (paramagnetisch) untersucht werden. Daher wurde die Probe mit Natriumdithionit (im Fall von Yap5 für ca. 10 Sekunden) reduziert

(285  $\mu$ l rekonstituiertes Protein + 15  $\mu$ l 40 mM Na-DT), in ein ESR-Röhrchen Blasenfrei überführt und in flüssigem Stickstoff langsam eingefroren. Die Probe wurde bis zur Messung in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### 4.6.19 Probenvorbereitung für Mößbauer-Spektroskopie

Bei der Mößbauer-Spektroskopie wird die rückstoßfreie Kernresonanzemission bzw. -absorption von  $\gamma$ -Strahlen bei Festkörpern ausgenutzt. Auch Atomkerne können elektromagnetische Strahlung in Form von  $\gamma$ -Quanten emittieren und absorbieren. Die von den Atomen eines chemischen Elements (radioaktives  $^{57}\text{Co}$ ) emittierte Strahlung kann von anderen Atomen des gleichen Elements ( $^{57}\text{Fe}$ ) absorbiert werden (Resonanzabsorption). Folgende Messeffekte spiegeln die Wechselwirkungen zwischen den Kernen und deren Elektronenumgebung wider (elektrische und magnetische Hyperfeinwechselwirkungen) und geben Rückschlüsse auf die Einheitlichkeit der Elektronenumgebungen der Mößbauerkerne zu:

- Isomerieverschiebung  $\delta$
- Elektrische Quadrupolaufspaltung  $\Delta E_Q$
- Magnetische Dipolwechselwirkung  $\Delta E_m$

Für die Mößbauer-Spektroskopie wurde 100  $\mu$ M tYap5 im 1:4 Verhältnis mit  $\text{Li}_2\text{S}$  und  $^{57}\text{Fe}$  anaerob rekonstruiert. Anschließend wurde das Protein über eine PD 10 Säule (s. 4.6.11) entsalzt, mit der Millipore (s. 4.6.12) aufkonzentriert und in eine Mößbauer-Küvette überführt sowie in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

## 5 Literaturverzeichnis

- Adrian GS, McCammon MT, Montgomery DL, Douglas MG. 1986. Sequences required for delivery and localization of the ADP/ATP translocator to the mitochondrial inner membrane. *Mol Cell Biol* 6: 626-34
- Amutha B, Pain D. 2003. Nucleoside diphosphate kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, Ynk1p: localization to the mitochondrial intermembrane space. *Biochem J* 370: 805-15
- Aquila H, Link TA, Klingenberg M. 1985. The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. Analysis of sequence homologies and of folding of the protein in the membrane. *Embo J* 4: 2369-76
- Aquila H, Misra D, Eulitz M, Klingenberg M. 1982. Complete amino acid sequence of the ADP/ATP carrier from beef heart mitochondria. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 363: 345-9
- Armstrong JS, Khmour O, Hecht SM. 2010. Does oxidative stress contribute to the pathology of Friedreich's ataxia? A radical question. *FASEB J* 24: 2152-63
- Atkinson A, Winge DR. 2009. Metal acquisition and availability in the mitochondria. *Chem Rev* 109: 4708-21
- Ayala-Castro C, Saini A, Outten FW. 2008. Fe-S cluster assembly pathways in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 72: 110-25
- Balk J, Pierik AJ, Netz DJ, Muhlenhoff U, Lill R. 2004. The hydrogenase-like Nar1p is essential for maturation of cytosolic and nuclear iron-sulphur proteins. *Embo J* 23: 2105-15
- Beinert H. 1978. Micro methods for the quantitative determination of iron and copper in biological material. *Methods Enzymol* 54: 435-45
- Beinert H, Holm RH, Munck E. 1997. Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* 277: 653-9
- Bennett J, Scott KJ. 1971. Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Anal Biochem* 43: 173-82
- Berggard T, Linse S, James P. 2007. Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics* 7: 2833-42
- Bernard DG, Netz DJ, Lagny TJ, Pierik AJ, Balk J. 2013. Requirements of the cytosolic iron-sulfur cluster assembly pathway in *Arabidopsis*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 368: 20120259
- Billard P, Dumond H, Bolotin-Fukuhara M. 1997. Characterization of an AP-1-like transcription factor that mediates an oxidative stress response in *Kluyveromyces lactis*. *Mol Gen Genet* 257: 62-70
- Bilsland E, Molin C, Swaminathan S, Ramne A, Sunnerhagen P. 2004. Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the HOG pathway are required for oxidative stress resistance. *Mol Microbiol* 53: 1743-56
- Birnboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-23
- Booker SJ, Cicchillo RM, Grove TL. 2007. Self-sacrifice in radical S-adenosylmethionine proteins. *Curr Opin Chem Biol* 11: 543-52
- Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, et al. 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14: 115-32
- Chen W, Dailey HA, Paw BH. 2010. Ferrochelatase forms an oligomeric complex with mitoferrin-1 and Abcb10 for erythroid heme biosynthesis. *Blood* 116: 628-30



- Cotruvo JA, Stubbe J. 2011. Class I ribonucleotide reductases: metallocofactor assembly and repair in vitro and in vivo. *Annu Rev Biochem* 80: 733-67
- Crack JC, Green J, Hutchings MI, Thomson AJ, Le Brun NE. 2012a. Bacterial iron-sulfur regulatory proteins as biological sensor-switches. *Antioxid Redox Signal* 17: 1215-31
- Crack JC, Green J, Thomson AJ, Le Brun NE. 2012b. Iron-sulfur cluster sensor-regulators. *Current opinion in chemical biology* 16: 35-44
- Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. 2004. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* 14: 1188-90
- Dagert M, Ehrlich SD. 1979. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 6: 23-8
- Dancis A, Yuan DS, Haile D, Askwith C, Eide D, et al. 1994. Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport. *Cell* 76: 393-402
- Delaunay A, Isnard AD, Toledano MB. 2000. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *Embo J* 19: 5157-66
- Delaunay A, Pflieger D, Barrault MB, Vinh J, Toledano MB. 2002. A thiol peroxidase is an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* 111: 471-81
- Dunham WR, Bearden AJ, Salmeen IT, Palmer G, Sands RH, et al. 1971. The two-iron ferredoxins in spinach, parsley, pig adrenal cortex, *Azotobacter vinelandii*, and *Clostridium pasteurianum*: studies by magnetic field Mossbauer spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 253: 134-52
- Dutkiewicz R, Marszalek J, Schilke B, Craig EA, Lill R, Muhlenhoff U. 2006. The hsp70 chaperone ssq1p is dispensable for iron-sulfur cluster formation on the scaffold protein isu1p. *J Biol Chem* 281: 7801-8
- Ellenberger TE, Brandl CJ, Struhl K, Harrison SC. 1992. The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted alpha helices: crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell* 71: 1223-37
- Fernandes L, Rodrigues-Pousada C, Struhl K. 1997. Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol Cell Biol* 17: 6982-93
- Foury F, Roganti T. 2002. Deletion of the mitochondrial carrier genes MRS3 and MRS4 suppresses mitochondrial iron accumulation in a yeast frataxin-deficient strain. *J Biol Chem* 277: 24475-83
- Fox TD, Folley LS, Mulero JJ, McMullin TW, Thorsness PE, et al. 1991. Analysis and manipulation of yeast mitochondrial genes. *Methods Enzymol* 194: 149-65
- Froschauer EM, Rietzschel N, Hassler MR, Binder M, Schweyen RJ, et al. 2013. The mitochondrial carrier Rim2 co-imports pyrimidine nucleotides and iron. *Biochem J* 455: 57-65
- Froschauer EM, Schweyen RJ, Wiesenberger G. 2009. The yeast mitochondrial carrier proteins Mrs3p/Mrs4p mediate iron transport across the inner mitochondrial membrane. *Biochim Biophys Acta* 1788: 1044-50
- Fujii Y, Shimizu T, Toda T, Yanagida M, Hakoshima T. 2000. Structural basis for the diversity of DNA recognition by bZIP transcription factors. *Nature structural biology* 7: 889-93
- Funk M, Niedenthal R, Mumberg D, Brinkmann K, Ronicke V, Henkel T. 2002. Vector systems for heterologous expression of proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* 350: 248-57
- Garland SA, Hoff K, Vickery LE, Culotta VC. 1999. *Saccharomyces cerevisiae* ISU1 and ISU2: members of a well-conserved gene family for iron-sulfur cluster assembly. *J Mol Biol* 294: 897-907
- Gelling C, Dawes IW, Richhardt N, Lill R, Muhlenhoff U. 2008. Mitochondrial Iba57p is required for Fe/S cluster formation on aconitase and activation of radical SAM enzymes. *Mol Cell Biol* 28: 1851-61

- Gitlin JD, Lill R. 2012. Special issue: Cell Biology of Metals. *Biochim Biophys Acta* 1823: 1405
- Glover JN, Harrison SC. 1995. Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature* 373: 257-61
- Gsaller F, Eisendle M, Lechner BE, Schrettl M, Lindner H, et al. 2012. The interplay between vacuolar and siderophore-mediated iron storage in *Aspergillus fumigatus*. *Metallomics : integrated biometal science* 4: 1262-70
- Guedener U, Heinisch J, Koehler GJ, Voss D, Hegemann JH. 2002. A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res* 30: e23
- Gutierrez-Aguilar M, Baines CP. 2013. Physiological and pathological roles of mitochondrial SLC25 carriers. *Biochem J* 454: 371-86
- Haas H. 2012. Iron - A Key Nexus in the Virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Frontiers in microbiology* 3: 28
- Haas H, Eisendle M, Turgeon BG. 2008. Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annu Rev Phytopathol* 46: 149-87
- Halliwell B, Gutteridge JM. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219: 1-14
- Hamza I, Dailey HA. 2012. One ring to rule them all: Trafficking of heme and heme synthesis intermediates in the metazoans. *Biochim Biophys Acta* 1823: 1617-32
- Han WG, Liu T, Lovell T, Noodleman L. 2005. Active site structure of class I ribonucleotide reductase intermediate X: a density functional theory analysis of structure, energetics, and spectroscopy. *J Am Chem Soc* 127: 15778-90
- Hausmann A, Aguilar Netz DJ, Balk J, Pierik AJ, Muhlenhoff U, Lill R. 2005. The eukaryotic P loop NTPase Nbp35: an essential component of the cytosolic and nuclear iron-sulfur protein assembly machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 3266-71
- Hausmann A, Samans B, Lill R, Muhlenhoff U. 2008. Cellular and Mitochondrial Remodeling upon Defects in Iron-Sulfur Protein Biogenesis. *J Biol Chem* 283: 8318-30
- Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. 2010. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* 142: 24-38
- Herrero E, Ros J, Belli G, Cabisco E. 2008. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta* 1780: 1217-35
- Heyde E, Ainsworth S. 1968. Kinetic studies on the mechanism of the malate dehydrogenase reaction. *J Biol Chem* 243: 2413-23
- Hortschansky P, Eisendle M, Al-Abdallah Q, Schmidt AD, Bergmann S, et al. 2007. Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex--a novel mechanism of gene regulation by iron. *Embo J* 26: 3157-68
- Hurst HC. 1995. Transcription factors 1: bZIP proteins. *Protein profile* 2: 101-68
- Hyde BB, Liesa M, Elorza AA, Qiu W, Haigh SE, et al. 2012. The mitochondrial transporter ABC-me (ABCB10), a downstream target of GATA-1, is essential for erythropoiesis in vivo. *Cell Death Differ* 19: 1117-26
- Ihrig J, Hausmann A, Hain A, Richter N, Hamza I, et al. 2010. Iron Regulation through the Back Door: Iron-Dependent Metabolite Levels Contribute to Transcriptional Adaptation to Iron Deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 9: 460-71
- Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153: 163-8
- Janke C, Magiera MM, Rathfelder N, Taxis C, Reber S, et al. 2004. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* 21: 947-62
- Jensen LT, Culotta VC. 2002. Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* FET4 by oxygen and iron. *J Mol Biol* 318: 251-60

- Kaplan CD, Kaplan J. 2009. Iron acquisition and transcriptional regulation. *Chem Rev* 109: 4536-52
- Kaplan J, McVey Ward D, Crisp RJ, Philpott CC. 2006. Iron-dependent metabolic remodeling in *S. cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1763: 646-51
- Kiley PJ, Beinert H. 2003. The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 6: 181-5
- Kim HJ, Khalimonchuk O, Smith PM, Winge DR. 2012. Structure, function, and assembly of heme centers in mitochondrial respiratory complexes. *Biochim Biophys Acta* 1823: 1604-16
- Kispal G, Csere P, Guiard B, Lill R. 1997. The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis. *FEBS Lett* 418: 346-50
- Kispal G, Csere P, Prohl C, Lill R. 1999. The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *Embo J* 18: 3981-9
- Kohlhaw GB. 2003. Leucine biosynthesis in fungi: entering metabolism through the back door. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 1-15
- Kolarov J, Kolarova N, Nelson N. 1990. A third ADP/ATP translocator gene in yeast. *J Biol Chem* 265: 12711-6
- Kolisek M, Zsurka G, Samaj J, Weghuber J, Schweyen RJ, Schweigel M. 2003. Mrs2p is an essential component of the major electrophoretic Mg<sup>2+</sup> influx system in mitochondria. *Embo J* 22: 1235-44
- Kosman DJ. 2010. Redox cycling in iron uptake, efflux, and trafficking. *J Biol Chem* 285: 26729-35
- Kuge S, Jones N, Nomoto A. 1997. Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *Embo J* 16: 1710-20
- Kumanovics A, Chen OS, Li L, Bagley D, Adkins EM, et al. 2008. Identification of FRA1 and FRA2 as genes involved in regulating the yeast iron regulon in response to decreased mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis. *J Biol Chem* 283: 10276-86
- Kumar A, Agarwal S, Heyman JA, Matson S, Heidtman M, et al. 2002. Subcellular localization of the yeast proteome. *Genes Dev* 16: 707-19
- Kunji ER. 2004. The role and structure of mitochondrial carriers. *FEBS Lett* 564: 239-44
- Kunji ER, Robinson AJ. 2006. The conserved substrate binding site of mitochondrial carriers. *Biochim Biophys Acta* 1757: 1237-48
- Kunji ER, Robinson AJ. 2010. Coupling of proton and substrate translocation in the transport cycle of mitochondrial carriers. *Curr Opin Struct Biol* 20: 440-7
- la Cour T, Kierner L, Molgaard A, Gupta R, Skriver K, Brunak S. 2004. Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein engineering, design & selection : PEDS* 17: 527-36
- Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL. 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240: 1759-64
- Lange H, Kaut A, Kispal G, Lill R. 2000. A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1050-5
- Lange H, Kispal G, Lill R. 1999. Mechanism of iron transport to the site of heme synthesis inside yeast mitochondria. *J Biol Chem* 274: 18989-96
- Lawson JE, Douglas MG. 1988. Separate genes encode functionally equivalent ADP/ATP carrier proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and analysis of AAC2. *J Biol Chem* 263: 14812-8
- Li H, Mapolelo DT, Dingra NN, Naik SG, Lees NS, et al. 2009. The yeast iron regulatory proteins Grx3/4 and Fra2 form heterodimeric complexes containing a [2Fe-2S] cluster with cysteinyl and histidyl ligation. *Biochemistry* 48: 9569-81
- Li J, Saxena S, Pain D, Dancis A. 2001a. Adrenodoxin reductase homolog (Arh1p) of yeast mitochondria required for iron homeostasis. *J Biol Chem* 276: 1503-9

- Li L, Bagley D, Ward DM, Kaplan J. 2008. Yap5 is an iron-responsive transcriptional activator that regulates vacuolar iron storage in yeast. *Mol Cell Biol* 28: 1326-37
- Li L, Chen OS, McVey Ward D, Kaplan J. 2001b. CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *J Biol Chem* 276: 29515-9
- Li L, Jia X, Ward DM, Kaplan J. 2011. Yap5 protein-regulated transcription of the TYW1 gene protects yeast from high iron toxicity. *J Biol Chem* 286: 38488-97
- Li L, Miao R, Bertram S, Jia X, Ward DM, Kaplan J. 2012. A role for iron-sulfur clusters in the regulation of transcription factor Yap5-dependent high iron transcriptional responses in yeast. *J Biol Chem* 287: 35709-21
- Li L, Murdock G, Bagley D, Jia X, Ward DM, Kaplan J. 2010. Genetic dissection of a mitochondria-vacuole signaling pathway in yeast reveals a link between chronic oxidative stress and vacuolar iron transport. *J Biol Chem* 285: 10232-42
- Lill R, Hoffmann B, Molik S, Pierik AJ, Rietzschel N, et al. 2012. The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1823: 1491-508
- Lin H, Li L, Jia X, Ward DM, Kaplan J. 2011. Genetic and biochemical analysis of high iron toxicity in yeast: iron toxicity is due to the accumulation of cytosolic iron and occurs under both aerobic and anaerobic conditions. *J Biol Chem* 286: 3851-62
- Liu Z, Butow RA. 2006. Mitochondrial retrograde signaling. *Annu Rev Genet* 40: 159-85
- Lyons TJ, Eide DJ. 2007. Transport and storage of metal ions in biology In *Biological Inorganic Chemistry*, ed. I Bertini, HB Gray, EI Stiefel, JS Valentine, pp. 57 - 77. Sausalito, CA: University Science Books
- Mantovani R. 1999. The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene* 239: 15-27
- Marobbio CM, Di Noia MA, Palmieri F. 2006. Identification of a mitochondrial transporter for pyrimidine nucleotides in *Saccharomyces cerevisiae*: bacterial expression, reconstitution and functional characterization. *Biochem J* 393: 441-6
- Mathews R, Charlton S, Sands RH, Palmer G. 1974. On the nature of the spin coupling between the iron-sulfur clusters in the eight-iron ferredoxins. *J Biol Chem* 249: 4326-8
- McNabb DS, Pinto I. 2005. Assembly of the Hap2p/Hap3p/Hap4p/Hap5p-DNA complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 4: 1829-39
- Miao R, Kim H, Koppolu UM, Ellis EA, Scott RA, Lindahl PA. 2009. Biophysical characterization of the iron in mitochondria from Atm1p-depleted *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 48: 9556-68
- Miroux B, Walker JE. 1996. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* 260: 289-98
- Molik S, Lill R, Muhlenhoff U. 2007. Methods for studying iron metabolism in yeast mitochondria. *Methods Cell Biol* 80: 261-80
- Molina L, Kahmann R. 2007. An *Ustilago maydis* gene involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification is required for virulence. *Plant Cell* 19: 2293-309
- Mortimer RK, Johnston JR. 1986. Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* 113: 35-43
- Muhlenhoff U, Gerber J, Richhardt N, Lill R. 2003a. Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *Embo J* 22: 4815-25
- Muhlenhoff U, Molik S, Godoy JR, Uzarska MA, Richter N, et al. 2010. Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster. *Cell Metab* 12: 373-85
- Muhlenhoff U, Richhardt N, Gerber J, Lill R. 2002a. Characterization of iron-sulfur protein assembly in isolated mitochondria. A requirement for ATP, NADH, and reduced iron. *J Biol Chem* 277: 29810-6

- Muhlenhoff U, Richhardt N, Ristow M, Kispal G, Lill R. 2002b. The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins. *Hum Mol Genet* 11: 2025-36
- Muhlenhoff U, Stadler JA, Richhardt N, Seubert A, Eickhorst T, et al. 2003b. A specific role of the yeast mitochondrial carriers MRS3/4p in mitochondrial iron acquisition under iron-limiting conditions. *J Biol Chem* 278: 40612-20
- Mullis KB, Faloona FA. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-50
- Netz DJ, Mascarenhas J, Stehling O, Pierik AJ, Lill R. 2013. Maturation of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins. *Trends Cell Biol*
- O'Shea EK, Klemm JD, Kim PS, Alber T. 1991. X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science* 254: 539-44
- Ojeda L, Keller G, Muhlenhoff U, Rutherford JC, Lill R, Winge DR. 2006. Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 281: 17661-9
- Palmieri F. 1994. Mitochondrial carrier proteins. *FEBS Lett* 346: 48-54
- Palmieri F, Agrimi G, Blanco E, Castegna A, Di Noia MA, et al. 2006. Identification of mitochondrial carriers in *Saccharomyces cerevisiae* by transport assay of reconstituted recombinant proteins. *Biochim Biophys Acta* 1757: 1249-62
- Palmieri L, Rottensteiner H, Girzalsky W, Scarcia P, Palmieri F, Erdmann R. 2001. Identification and functional reconstitution of the yeast peroxisomal adenine nucleotide transporter. *Embo J* 20: 5049-59
- Paradkar PN, Zumbrennen KB, Paw BH, Ward DM, Kaplan J. 2009. Regulation of mitochondrial iron import through differential turnover of mitoferrin 1 and mitoferrin 2. *Mol Cell Biol* 29: 1007-16
- Perlstein DL, Ge J, Ortigosa AD, Robblee JH, Zhang Z, et al. 2005. The active form of the *Saccharomyces cerevisiae* ribonucleotide reductase small subunit is a heterodimer in vitro and in vivo. *Biochemistry* 44: 15366-77
- Philpott CC, Protchenko O. 2008. Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 7: 20-7
- Picciocchi A, Saguez C, Boussac A, Cassier-Chauvat C, Chauvat F. 2007. CGFS-type monothiol glutaredoxins from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 and other evolutionary distant model organisms possess a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster. *Biochemistry* 46: 15018-26
- Pimentel C, Vicente C, Menezes RA, Caetano S, Carreto L, Rodrigues-Pousada C. 2012. The role of the Yap5 transcription factor in remodeling gene expression in response to Fe bioavailability. *PLoS one* 7: e37434
- Puig S, Askeland E, Thiele DJ. 2005. Coordinated remodeling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mRNA degradation. *Cell* 120: 99-110
- Puig S, Vergara SV, Thiele DJ. 2008. Cooperation of two mRNA-binding proteins drives metabolic adaptation to iron deficiency. *Cell Metab* 7: 555-64
- Pujol-Carrion N, Belli G, Herrero E, Nogues A, de la Torre-Ruiz MA. 2006. Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 119: 4554-64
- Richardson DR, Lane DJ, Becker EM, Huang ML, Whitnall M, et al. 2010. Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 10775-82
- Rodrigues-Pousada C, Menezes RA, Pimentel C. 2010. The Yap family and its role in stress response. *Yeast* 27: 245-58
- Rouhier N, Couturier J, Johnson MK, Jacquot JP. 2010. Glutaredoxins: roles in iron homeostasis. *Trends Biochem Sci* 35: 43-52
- Rutherford JC, Bird AJ. 2004. Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryot Cell* 3: 1-13

- Rutherford JC, Jaron S, Ray E, Brown PO, Winge DR. 2001. A second iron-regulatory system in yeast independent of Aft1p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 14322-7
- Sambrook J, Russel DW. 2001. *Molecular Cloning - A laboratory manual, 3rd edition*. ColdSpring Harbour, USA: CSH Laboratory Press.
- Saraste M, Walker JE. 1982. Internal sequence repeats and the path of polypeptide in mitochondrial ADP/ATP translocase. *FEBS Lett* 144: 250-4
- Schrettl M, Beckmann N, Varga J, Heinekamp T, Jacobsen ID, et al. 2010. HapX-mediated adaption to iron starvation is crucial for virulence of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog* 6: e1001124
- Schrettl M, Haas H. 2011. Iron homeostasis-Achilles' heel of *Aspergillus fumigatus*? *Curr Opin Microbiol* 14: 400-5
- Schünemann V, Winkler H. 2000. Structure and dynamics of biomolecules studied by Mössbauer spectroscopy. *Rep. Prog. Phys.* 63: 263-353
- Seibel NM, Eljouni J, Nalaskowski MM, Hampe W. 2007. Nuclear localization of enhanced green fluorescent protein homomultimers. *Anal Biochem* 368: 95-9
- Seldeen KL, McDonald CB, Deegan BJ, Farooq A. 2008. Thermodynamic analysis of the heterodimerization of leucine zippers of Jun and Fos transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* 375: 634-8
- Shaw GC, Cope JJ, Li L, Corson K, Hersey C, et al. 2006. Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation. *Nature* 440: 96-100
- Sherman F. 2002. Getting started with Yeast. *Methods Enzymol* 350: 3 - 41
- Stehling O, Vashisht AA, Mascarenhas J, Jonsson ZO, Sharma T, et al. 2012. MMS19 assembles iron-sulfur proteins required for DNA metabolism and genomic integrity. *Science* 337: 195-9
- Sutak R, Lesuisse E, Tachezy J, Richardson DR. 2008. Crusade for iron: iron uptake in unicellular eukaryotes and its significance for virulence. *Trends Microbiol* 16: 261-8
- Tan K, Feizi H, Luo C, Fan SH, Ravasi T, Ideker TG. 2008. A systems approach to delineate functions of paralogous transcription factors: role of the Yap family in the DNA damage response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 2934-9
- Toda T, Shimanuki M, Yanagida M. 1991. Fission yeast genes that confer resistance to staurosporine encode an AP-1-like transcription factor and a protein kinase related to the mammalian ERK1/MAP2 and budding yeast FUS3 and KSS1 kinases. *Genes Dev* 5: 60-73
- Troadec MB, Warner D, Wallace J, Thomas K, Spangrude GJ, et al. 2011. Targeted deletion of the mouse Mitoferrin1 gene: from anemia to protoporphyria. *Blood* 117: 5494-502
- Ueta R, Fujiwara N, Iwai K, Yamaguchi-Iwai Y. 2012. Iron-induced dissociation of the Aft1p transcriptional regulator from target gene promoters is an initial event in iron-dependent gene suppression. *Mol Cell Biol* 32: 4998-5008
- Uzarska MA, Dutkiewicz R, Freibert SA, Lill R, Muhlenhoff U. 2013. The mitochondrial Hsp70 chaperone Ssq1 facilitates Fe/S cluster transfer from Isu1 to Grx5 by complex formation. *Molecular biology of the cell* 24: 1830-41
- Van Dyck E, Jank B, Ragnini A, Schweyen RJ, Duyckaerts C, et al. 1995. Overexpression of a novel member of the mitochondrial carrier family rescues defects in both DNA and RNA metabolism in yeast mitochondria. *Mol Gen Genet* 246: 426-36
- Veatch JR, McMurray MA, Nelson ZW, Gottschling DE. 2009. Mitochondrial dysfunction leads to nuclear genome instability via an iron-sulfur cluster defect. *Cell* 137: 1247-58
- Vinson CR, Sigler PB, McKnight SL. 1989. Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science* 246: 911-6
- Vogelstein B, Gillespie D. 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 615-9

- Vozza A, Blanco E, Palmieri L, Palmieri F. 2004. Identification of the mitochondrial GTP/GDP transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279: 20850-7
- Waldherr M, Ragnini A, Jank B, Teply R, Wiesenberger G, Schweyen RJ. 1993. A multitude of suppressors of group II intron-splicing defects in yeast. *Curr Genet* 24: 301-6
- Weinreb O, Mandel S, Youdim MB, Amit T. 2013. Targeting dysregulation of brain iron homeostasis in Parkinson's disease by iron chelators. *Free Radic Biol Med* 62: 52-64
- White MF, Dillingham MS. 2012. Iron-sulphur clusters in nucleic acid processing enzymes. *Curr Opin Struct Biol* 22: 94-100
- Woonter M, Jaehning JA. 1990. Accurate initiation by RNA polymerase II in a whole cell extract from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 265: 8979-82
- Yao R, Zhang Z, An X, Bucci B, Perlstein DL, et al. 2003. Subcellular localization of yeast ribonucleotide reductase regulated by the DNA replication and damage checkpoint pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 6628-33
- Yoon H, Zhang Y, Pain J, Lyver ER, Lesuisse E, et al. 2011. Rim2, a pyrimidine nucleotide exchanger, is needed for iron utilization in mitochondria. *Biochem J* 440: 137-46
- Zhang Y, Lyver ER, Nakamaru-Ogiso E, Yoon H, Amutha B, et al. 2008. Dre2, a conserved eukaryotic Fe/S cluster protein, functions in cytosolic Fe/S protein biogenesis. *Mol Cell Biol* 28: 5569-82
- Zheng L, Baumann U, Reymond JL. 2004. An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res* 32: e115
- Zheng L, White RH, Cash VL, Dean DR. 1994. Mechanism for the desulfurization of L-cysteine catalyzed by the *nifS* gene product. *Biochemistry* 33: 4714-20

## 6 Abkürzungsverzeichnis

<b>Amp</b>	Ampicillin
<b>APS</b>	Ammoniumperoxodisulfat
<b>ATP</b>	Adenosin-5'-Triphosphat
<b>BPS</b>	Bathophenanthrolin Disulfonat
<b>bZIP</b>	<i>basic Leucine Zipper</i>
<b>C-Terminus</b>	Carboxyterminus
<b>CIA</b>	<i>cytosolic iron-sulfur cluster protein assembly</i>
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	einfach destilliertes Wasser
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	doppelt destilliertes Wasser
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DO</b>	<i>Drop out mix</i>
<b>DTT</b>	1,4-Dithiothreitol
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>FAC</b>	Ferriammoniumcitrat/Ammoniumeisen(III)-citrat
<b>Fe/S</b>	Eisen-Schwefel
<b>g</b>	Gramm bzw. Erdbeschleunigung bzw. Landé-Faktor ( <i>g</i> -Wert)
<b>Gal</b>	Galactose
<b>Glu</b>	Glucose
<b>Gly</b>	Glycerol
<b>HA</b>	Hämagglutinin
<b>His<sub>6</sub></b>	Hexahistidinyl
<b>ISC</b>	<i>iron-sulfur cluster assembly</i>
<b>kb</b>	Kilobasenpaare
<b>LB</b>	Luria-Bertan
<b>M</b>	molar (mol/l)
<b>MCF</b>	mitochondriale Carrier Familie
<b>mtDNA</b>	mitochondriale DNA
<b>N-Terminus</b>	Aminoterminal
<b>NES</b>	nukleäres Exportsignal
<b>NTA</b>	Nitrilotriacetat
<b>OD<sub>x</sub></b>	optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
<b>ORF</b>	<i>open reading frame</i>
<b>PAGE</b>	Polyacrylamidgelelektrophorese
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion
<b>PEG</b>	Polyethylenglycol
<b>PMSF</b>	Phenylmethylen-sulfonylfluorid
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>sog.</b>	sogenannt
<b>TCA</b>	Trichloressigsäure
<b>TCEP</b>	Tris-(2-Carboxyethyl)-Phosphin
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<b>v/v</b>	Volumen pro Volumen
<b>w/v</b>	Gewicht pro Volumen
<b>WT</b>	Wildtyp
<b>Yap5</b>	<i>Yeast activator protein 5</i>



## **7 Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Bonn:

Bartels, Barthlott, Bleckmann, Dahl, Fürst, Galinski, Haas, Hoch, Höhfeld, Kirfel, Klemme, Knoop, Koch, Magin, Menzel, Perry, Sauer, Scheidtmann, Schreiber, Traub, Volkmann, von der Emde, Voos, Willecke

## 8 Publikationen und Tagungsbeiträge

### Teile dieser Arbeit wurden oder werden in folgenden Artikeln publiziert:

Lill, R., Hoffmann, B., Molik, S., Pierik, A. J., Rietzschel, N., Stehling, O., Uzarska, M. A., Weibert, H., Wilbrecht, C. and Mühlenhoff, U. (2012) The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim Biophys Acta*. **1823**, 1491-1508

Froschauer, E. M., Rietzschel, N., Hassler, M. R., Binder, M., Schweyen, R. J., Lill, R., Mühlenhoff, U. and Wiesenberger, G. (2013) The mitochondrial carrier Rim2 co-imports pyrimidine nucleotides and iron. *Biochem J*. **455**, 57-65

Rietzschel, N., Pierik, A. J., Bill, E., Lill, R. and Mühlenhoff, U. The bZIP stress response regulator Yap5 harbors a [2Fe-2S] cluster that is essential for iron sensing. Manuskript in Vorbereitung

### Im Verlauf der Promotion wurden weiterhin Beiträge zu folgenden Artikeln geleistet:

Lewrenz, I., Rietzschel, N., Guiard, B., Lill, R., van der Laan, M. and Voos, W. (2013) The functional interaction of mitochondrial Hsp70s with the escort protein Zim17 is critical for Fe/S biogenesis and substrate interaction at the inner membrane preprotein translocase. *J Biol Chem*. **288**, 30931-30943

Gsaller, F., Klammer, V., Lechner, B. E., Hortschansky, P., Mühlenhoff, U., Rietzschel, N., Werner, E. R. and Haas, H. *Aspergillus fumigatus* HapX is a Janus transcription factor required for adaptation to both iron starvation and iron excess. Manuskript in Vorbereitung

**Tagungsbeiträge (Auswahl):**

Rietzschel, N., Mühlenhoff, U., Froschauer, E., Schweyen, R., Wiesenberger, G. and Lill, R. The role of the nucleotide carrier Rim2 in mitochondrial iron transport (Poster) - 6th International Conference: Biogenesis of iron-sulfur proteins and regulatory functions 2011, Cambridge, UK

Rietzschel, N., How mitochondria import iron: The role of the mitochondrial pyrimidine nucleotide carrier Rim2 (Vortrag) - Klausurtagung SFB 593 2012, Kleinwalsertal, Österreich

Rietzschel, N., Hassler, M. R., Froschauer, E. M., Binder, M., Schweyen, R. J., Lill, R., Mühlenhoff, U. and Wiesenberger, G. How mitochondria import iron: The role of the mitochondrial pyrimidine nucleotide carrier Rim2 (Poster) – The FEBS / EMBO Course on Mitochondria in life, death and disease 2012, Kreta, Griechenland

Molik, S., Paul, V. D., Rietzschel, N. and Lill, R. Eukaryotic Fe/S-Cluster –small but essential- (Poster) – SFB TR1 Endosymbiosis: From Prokaryotes to Eukaryotic Organelles 2012, München, Deutschland

Rietzschel, N., Mühlenhoff, U. and Lill, R. Biochemical characterization of iron sensing by the bZIP-transcription factor Yap5 (Poster) – Gordon Research Conference Cell Biology of Metals 2013, Salve Regina University, Newport RI, USA

Rietzschel, N., Biochemical characterization of iron sensing by the bZIP-transcription factor Yap5 (Vortrag und Poster) – Klausurtagung SFB 987 Graduate School 2013, Friedewald, Deutschland

## 9 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt den folgenden Personen:

Zuallererst danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Roland Lill und meinem Supervisor PD Dr. Uli Mühlenhoff für die Möglichkeit an diesem Institut promovieren zu dürfen. Die stete Diskussionsbereitschaft, die wertvollen Ratschläge sowie die gute Betreuung haben erst zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Insbesondere bedanke ich mich für die Erfahrungen und die Möglichkeiten meine Ergebnisse auf verschiedenen wissenschaftlichen Konferenzen zu präsentieren.

Ebenfalls bedanke ich mich bei meinen Kooperationspartnern, der Wiener und der Innsbrucker Arbeitsgruppe, sowie Prof. Dr. Antonio J. Pierik und Prof. Dr. Eckhard Bill für die Zusammenarbeit in der ESR- bzw. Mößbauer-Spektroskopie. Dem SFB 593 und dem SFB 987 danke ich für die Finanzierung. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Prof. Dr. Michael Bölker für die Organisation und die konstruktiven Diskussionen im Graduiertenkolleg danken.

Der gesamten AG Lill, die in den vergangenen Jahren mit bereichernden Tipps und Diskussionsbeiträgen wiederholt zur Stelle waren, gebührt ein großer Dank. Über die letzten Jahre sind aus Kollegen Freunde geworden. Insbesondere meinem *lucky-twin* Vicky Paul und Marta Uzarska danke ich für die überwiegend schöne Zeit im und außerhalb des Labors. Ein großes Dankeschön, nicht nur für die Unterstützung im Laboralltag sondern auch für den guten Zusammenhalt, die schönen Grillfeiern, Sommerfeste, Betriebsausflüge und Weihnachtsfeiern gilt dem gesamten Institut für Zytobiologie.

All meinen lieben Freunden danke ich für die wertvolle Ablenkung zwischendurch, die zahlreichen ermutigenden Worte und das geduldige Korrekturlesen, vor allem von Ella Mass.

Bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meinem Bruder möchte ich mich für die großartige, ausnahmslose Unterstützung in allen Lagen meines Lebens bedanken.